

Pro gradu -tutkielma

Eläin- ja kasviproteiinipainotteisia  
ruokavalioita noudattaneiden  
henkilöiden ulosteveden vaikutus  
HCA-7-paksusuolisyöpäsolujen  
viabiliteettiin

Vesa Lapinkero  
Ravitsemustiede  
Elintarvike- ja ravitsemustieteiden osasto  
Helsingin yliopisto  
Huhtikuu 2020



<b>Tiedekunta</b> Maatalous-metsätieteellinen tiedekunta		<b>Osasto</b> Elintarvike- ja ravitsemustieteiden osasto
<b>Tekijä</b> Vesa Kalevi Lapinkero		
<b>Työn nimi</b> Eläin- ja kasviproteiinipainotteisia ruokavalioita noudattaneiden henkilöiden ulosteveden vaikutus HCA-7-paksusuolisyöpäsolujen viabiliteettiin		
<b>Oppiaine</b> Ravitsemustiede		
<b>Työn laji</b> Pro gradu -tutkielma	<b>Aika</b> Huhtikuu 2020	<b>Sivumäärä</b> 70
<b>Tiivistelmä</b> <p><i>Tausta ja tavoitteet:</i> Suolistosyövät eli paksu- ja peräsuolen syövät ovat maailmanlaajuisesti miehillä kolmanneksi ja naisilla toiseksi yleisin syöpätyyppi. Suolistosyöpien riskiin vaikuttavat elintavat ja erityisesti ruokavalio. Ruokavalion vaikutuksen paksu- ja peräsuolensyöpien riskiin ajatellaan välittyvän suolen sisällön nestemäisen osan eli ulosteveden kautta; syödyn ruoan tai mikrobiston siitä tuottamien yhdisteiden täytyy olla liuenneessa muodossa, jotta ne voivat vaikuttaa paksusuolen soluihin ja erityisesti kryptien pohjalla oleviin jakaantuviin kantasoluihin ja sitä kautta syöpien riskiin. Tässä tutkimuksessa hyödynnettiin ulostenäytteitä, jotka oli kerätty erilaisia kasvi- ja eläinperäisten proteiinien suhteellisia osuuksia sisältäviä ruokavalioita noudattavilta henkilöiltä. Tavoitteena oli tutkia, kuinka ulostenäytteistä eristetty ulostevesi vaikutti HCA-7-paksusuolisyöpäsolulinjan solujen viabiliteettiin. Lisäksi testattiin, korreloiko tutkittavien painoindeksi (BMI), ulosteveden pH, ulosteen N-nitrosoyhdisteiden (NOC) pitoisuudet tai kuidun, proteiinin, kalsiumin tai energian saanti ravinnosta viabiliteetin kanssa.</p> <p><i>Aineisto ja menetelmät:</i> Yhteensä 146 tervettä vapaaehtoista (ikä 20–69 v, BMI 18,5–35) satunnaistettiin 12 viikoksi kolmelle tutkimusruokavaliolle. Ruokavalioiden proteiinisisältö (tavoite 17 E%) tuli eläin- ja kasviperäisistä lähteistä osuuksilla 70/30 % (ELÄIN-ryhmä, n=46), 50/50 % (50/50-ryhmä, n=44) ja 30/70 % (KASVI-ryhmä, n=44). Ruoankäyttöä ja ravintoaineiden saantia seurattiin neljän päivän ruokapäiväkirjalla ennen tutkimusta ja sen lopussa. Ulostenäytteet kerättiin samoista aikapisteistä. Ulostenäytteet homogenoitiin vedellä 1:1 laimennettuna, homogeneaatti ultrasentrifuugattiin, supernatantin eli ulosteveden pH mitattiin ja se suodatettiin steriiliksi 0,22 µm:n suodattimella. Ihmisen paksusuolisyövän HCA-7-solulinjan soluja inkuboitiin 96-kaivoisella solukasvatuslevyllä ensin noin vuorokausi kasvatusliuoksessa, jotta solut kiinnittyvät levyille. Sitten syöpäsolut altistettiin jokaiselta tutkittavalta peräisin oleville ulostevesinäytteille kolmena rinnakkaisnäytteenä ja kolmena laimennoksena (10 til-%, 20 til-% ja 30 til-%), ja inkuboitiin 24 h. Tämän jälkeen elävien solujen määrä määritettiin kolorimetrisesti käyttämällä WST-8-reagenssia. Viabiliteetti (%) saatiin laskemalla näytekuppien elävien solujen suhteellinen osuus verrattuna kontrollisolukuoppien elävien solujen määrään. Ruokavalioryhmien välisten viabiliteettierojen tilastollinen merkitsevyys testattiin kovarianssianalyysillä (ANCOVA) käyttäen kovariaattina alkupisteen viabiliteettia. Korrelaatiot tutkittiin Pearsonin korrelaatiotestillä.</p> <p><i>Tulokset:</i> Kaikkiaan 134 tutkittavalta saatiin eristettyä ulostevesinäyte. Intervention lopussa näkyi viabiliteetissa (%) tilastollisesti merkitseviä eroja ryhmien välillä 30 til-% ulostevesipitoisuudella (ANCOVA p=0,005). Viabiliteetti (%) oli pienin KASVI-ryhmällä (kovariaattikorjattu keskiarvoestimaatti 30,0 ± 1,9) ja erosi ryhmien välisessä keskinäisessä vertailussa sekä ELÄIN-ryhmästä (37,8 ± 1,8; p = 0,011 Bonferroni-korjauksella) että 50/50-ryhmästä (37,1 ± 1,8; p = 0,021). Viabiliteetti korreloi merkitsevästi (p &lt; 0,05) painoindeksin kanssa kaikilla ulosteveden pitoisuuksilla (10 til-%: R = 0,210; 20 til-%: R = 0,366; 30 til-%: R = 0,319) sekä ulosteveden pH:n kanssa pitoisuuksilla 20 til-% (R = 0,204) ja 30 til-% (R = 0,249). Pitoisuuksilla 10 til-% ja 30 til-% viabiliteetti oli myös merkitsevästi yhteydessä proteiinin saantiin laskettuna sekä g/vrk (10 til-%: R = 0,199; 30 til-%: R = 0,181) että energiaan suhteutettuna (E%) (10 til-%: R = 0,179; 30 til-%: R = 0,236). Kuidun ja kalsiumin saanti tai ulosteen NOC-pitoisuudet eivät korreloineet viabiliteetin kanssa.</p> <p><i>Johtopäätökset:</i> Tutkimuksen perusteella KASVI-ryhmän ulostevesi voisi vähentää HCA-7-paksusuolisyöpäsolujen viabiliteettia <i>in vitro</i> verrattuna 50/50- ja ELÄIN-ryhmien ulosteveeseen. Tämä voi viitata siihen, että kasviproteiinilähteiden lisääminen ja eläinproteiinilähteiden vähentäminen alentaa suolistosyövän riskiä. Tarkempien johtopäätösten tekemiseksi tulisi altistuskoe toistaa useammalla paksusuolisyöpäsolulinjalla sekä jollakin normaalin kaltaisella kontrollisolulinjalla.</p> <p><b>Avainsanat</b> suolistosyöpä, paksusuolisyöpä, kasviproteiini, eläinproteiini, HCA-7, viabiliteetti, solukoe, syöpäsolulinja, ulostevesi, WST-8</p> <p><b>Säilytyspaikka</b> Maatalous-metsätieteellinen tiedekunta, Elintarvike- ja ravitsemustieteiden osasto</p> <p><b>Muita tietoja</b> Ohjaaja: Anne-Maria Pajari, dosentti, yliopistonlehtori</p>		



<b>Faculty</b> Faculty of Agriculture and Forestry		<b>Department</b> Department of Food and Nutrition
<b>Author</b> Vesa Kalevi Lapinkero		
<b>Title</b> Effect of fecal water from individuals on diets with emphasis on either animal or plant protein sources on HCA-7 colon cancer cell viability		
<b>Subject</b> Nutritional sciences		
<b>Level</b> Master's Thesis	<b>Month and year</b> April 2020	<b>Number of pages</b> 70
<b>Abstract</b> <p><i>Background and aim:</i> Colorectal cancers (CRC) are the third most common type of cancer in men and the second most common in women worldwide. The risk for CRC is influenced by lifestyle factors, especially diet. The effect of diet on CRC risk is thought to be mediated by the liquid phase of the feces called fecal water (FW); the components in food or produced from food by the microbiome must be in soluble form to have an effect on the colon epithelial cells, especially on the proliferating cells at the bottom of the colonic crypts, and consequently on CRC risk. In this study, we examined how viability of cells from human colon cancer cell line HCA-7 was affected, when the cells were exposed to FW extracted from fecal samples from study participants eating diets with emphasis on either animal or plant protein sources. Additionally we tested, whether body mass index (BMI), pH of the FW, amount of N-nitroso compounds in feces (NOC), or intake of fiber, protein, calcium or energy correlate with viability.</p> <p><i>Materials and methods:</i> 146 healthy volunteers (age 20–69, BMI 18,5–35) were randomly assigned to three intervention diet groups for 12 weeks. Protein content of the diets (target 17 E%) came from animal and plant sources in proportion of 70/30 % (ANIMAL-group, n=46), 50/50 % (50/50-group, n=44) and 30/70 % (PLANT-group, n=44). Food consumption was assessed using 4-day food records kept by the participants before and at the end of the intervention period. Fecal samples were collected from the same time periods. Fecal samples were diluted with water in ratio of 1:1 and homogenized, homogenate was ultracentrifuged, pH of the supernatant i.e. FW was measured and finally the FW was filtered sterile using a 0,22 µm filter. HCA-7-cells were first incubated roughly 24 h on 96-well cell culture plate in growth medium so that the cells were attached to the plate. Then three parallel FW samples in three different dilution (10 vol-%, 20 vol-% and 30 vol-%) from each study participant were added on to the plate, and the plate was further incubated exactly 24 h. After that, the amount of living cells was measured colorimetrically using WST-8-reagent. Viability (%) was determined by calculating the proportion of living cells in sample containing wells compared to the living cells in the control wells. Statistical significance of the differences of viability between the diet groups was tested by analysis of covariance (ANCOVA) using the viability at the baseline as covariate. Correlations were analyzed using Pearson's correlation test.</p> <p><i>Results:</i> FW samples were obtained from 134 study participants. There was a statistically significant difference in viability between the groups' means in samples with FW content of 30 vol-% (ANCOVA p=0,005). Viability (%) was smallest in the PLANT-group (co-variate adjusted mean 30,0 ± 1,9), and in the reciprocal comparison it differed from both the ANIMAL-group (37,8 ± 1,8; p = 0,011, Bonferroni correction) and the 50/50-group (37,1 ± 1,8; p = 0,021). At the end of the study, there were statistically significant correlation (p &lt; 0,05) between viability and BMI in all of the FW contents (10 vol-%: Pearson correlation coefficient R = 0,210; 20 vol-%: R = 0,366; 30 vol-%: R = 0,319), pH of the FW in the FW contents of 20 vol-% (R = 0,204) and 30 vol-% (R = 0,249). The intake of protein (g/d) correlated in contents of 10 vol-% (R = 0,199) and 30 vol-% (R = 0,181). Also, the intake of protein in proportion to energy intake (E%) correlated in contents of 10 vol-% (R = 0,179) and 30 vol-% (R = 0,236). The intake of fiber, calcium and the amount of NOC:s in feces did not correlate with viability.</p> <p><i>Conclusions:</i> In this study, the FW from the PLANT group reduced the viability of HCA-7 cells <i>in vitro</i> compared to the FW of the 50/50 and the ANIMAL groups. This could indicate that increasing the consumption of plant-based protein sources and decreasing that of animal proteins may decrease the risk of CRC. To strengthen the current results, the exposure experiments should be replicated also using different colon cancer cell lines and a normal-like control cell line.</p>		
<b>Keywords</b> Colon cancer, colorectal cancer, CRC, plant protein, animal protein, HCA-7, viability, cancer cell line, fecal water, WST-8		
<b>Where deposited</b> Faculty of Agriculture and Forestry, Department of Food and Nutrition		
<b>Additional information</b> Supervisor: Anne-Maria Pajari, University Lecturer, Adjunct Professor		

## Sisällys

<b>Käytetyt lyhenteet .....</b>	<b>6</b>
<b>1. Johdanto.....</b>	<b>7</b>
<b>2. Teoreettinen viitekehys .....</b>	<b>9</b>
2.1. Syöpien yleiset piirteet.....	9
2.2. Suolistosyöpien kehittyminen .....	10
2.3. Suolistosyöpäriskin biomarkerit ja ravinto .....	12
2.4. Ulosteveden käyttö suolistosyöpäriskin arvioinnissa .....	13
2.4.1. Uloste ja paksusuolen luumenin olosuhteet .....	13
2.4.2. Ulostevesi ja ulosteveden biologinen aktiivisuus .....	14
2.5. Viabiliteettimittausten käyttö syöpätutkimuksessa.....	16
2.6. Proteiininlähteiden vaikutus suolistosyövän riskiin .....	18
2.6.1. Havainnoivia tutkimuksia .....	18
2.6.2. Mekanistinen näkökulma .....	20
<b>3. Tutkimuksen tavoitteet.....</b>	<b>22</b>
<b>4. Aineisto .....</b>	<b>23</b>
4.1. ScenoProt-interventio .....	23
4.2. Tutkimusruokavaliot.....	23
4.3. Ulostenäytteiden keräys .....	24
4.4. Eettiset kysymykset ja tietoturva .....	25
<b>5. Menetelmät.....</b>	<b>26</b>
5.1. Ulosteveden eristys .....	26
5.2. Solukokeet .....	26
5.2.1. Laitteet ja liuokset .....	26
5.2.2. Solujen sulatus, alkukasvatus ja viljelmän ylläpito .....	27
5.2.3. Solujen ulostevesiäلتistus ja viabiliteetin mittaust .....	28
5.3. Tilastolliset analyysit.....	31
<b>6. Tulokset .....</b>	<b>32</b>
6.1. Taustatiedot .....	32
6.1.1. Tutkittavat ja tutkimuksen kulku .....	32
6.1.2. Ravintoaineiden saanti.....	33
6.2. Ruokavalioryhmän vaikutus HCA-7-solujen viabiliteettiin.....	33

6.3. Ulosteveden pH .....	36
6.4. Viabiliteetin, pH:n ja ravintotekijöiden välisiä yhteyksiä.....	36
6.5. Ulosteveden ja WST-8-reagenssin välisen interaktion vähentämisen vaikutus tuloksiin.....	37
<b>7. Pohdinta .....</b>	<b>39</b>
7.1. Viabiliteettitulokset .....	39
7.2. Ulosteveden pH .....	40
7.3. Ulosteveden ja WST-8-reagenssin välisen interaktion vähentämisen vaikutus viabiliteettituloksiin .....	41
7.4. Tutkimuksen vahvuudet ja heikkoudet .....	42
7.4.1. Vahvuudet.....	42
7.4.2. Heikkoudet ja harhan lähteet.....	43
7.5. Tulosten merkittävyys ja tulevaisuuden tutkimustarpeet .....	45
<b>8. Johtopäätökset .....</b>	<b>47</b>
<b>Lähteet .....</b>	<b>48</b>
<b>Liitteet.....</b>	<b>56</b>
Liite 1. Ohjeet ulostenäytteen ottoa varten (aloituskäynti) .....	56
Liite 2. Ulostevedeneristysprotokolla.....	60
Liite 3. ScenoProtein HCA-7-solujen ulostevesialtistuskokeen työhöje .....	62
Liite 4. Ulosteveden ja WST-8-reagenssin välinen interaktio .....	65
Interaktioabsorbanssi ja ryhmien väliset erot interaktiossa.....	65
Korrelaatiot interaktion kanssa.....	67
Pohdintaa interaktiosta ja sen merkityksestä.....	69

## Käytetyt lyhenteet

BMI	painoindeksi (engl. body mass index)
COX-2	syklo-oksigenaasi-2-entsyymi (engl. cyclo-oxygenase-2)
DMEM	solujen kasvatusliuos (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
DNA	deoksiribonukleiinihappo, solun perimäaine
FBS	naudan sikiön veriseerumi (Fetal Bovine Serum)
HCA-7	ihmisen paksusuolisyöpäsolulinja (engl. human colon adenocarcinoma)
NOC	N-nitrosoyhdisteet
PAH	polyaromaattiset hiilivety-yhdisteet
PBS	fosfaattipuskuroitu suolaliuos (engl. phosphate buffered saline)
RCT	satunnaistettu kontrolloitu tutkimus (engl. randomized controlled trial)
SCFA	lyhytketjuiset rasvahapot (engl. short chain fatty acids)
til-%	tilavuusprosentti
WCRF	Maailman syöväntutkimussäätiö (engl. World Cancer Research Foundation)
WST-8	solulaskentareagenssi, vesiliukoinen tetratsoliumsuola (engl. water soluble tetrazolium salt)

## 1. Johdanto

Suolistosyövät eli paksu- ja peräsuolen syövät ovat maailmanlaajuisesti miehillä kolmanneksi ja naisilla toiseksi yleisin syöpätyyppi, ja tapausten määrän uskotaan yhä olevan nousussa (1). Suolistosyöpien ilmaantuvuus vaihtelee maailmanlaajuisesti jopa kymmenkertaisesti; vähäisintä se on kehittyvissä maissa, ja karkeasti ottaen ilmaantuvuus on sitä suurempi, mitä parempi elintaso maassa on. Suolistosyöpiä voidaankin pitää eräänä tyyppiesimerkkinä elintapojen länsimaistumisen mukanaan tuomista sairauksista (1).

Viidestä kymmeneen prosenttia suolistosyöpätapauksista johtuu tunnetuista syöpää aiheuttavista geneettisistä poikkeamista, ja lisäksi noin 20 % tapauksista löytyvät ihmisiltä, joilla on suvussa ollut runsaasti suolistosyöpiä (1). Suurimman osan syöpäriskistä on kuitenkin havaittu olevan yhteydessä elämäntapatekijöihin; esimerkiksi Iso-Britannian suolistosyöpätapauksista vuonna 2010 noin puolen arvioidaan johtuneen elämäntapatekijöistä (2).

World Cancer Research Fundin mukaan (1) on vahvaa näyttöä siitä, että fyysinen aktiivisuus, täysjyvävilja, ravintokuitu, maitotuotteet sekä kalsiumin saanti ravinnosta ja/tai ravintolisistä vähentävät riskiä sairastua suolistosyöpiin, ja lihajalosteet, alkoholijuomat, ylipaino, punainen liha ja tupakointi lisäävät riskiä. Jonkin verran näyttöä on myös siitä, että C-vitamiinipitoiset elintarvikkeet, kala, D-vitamiinin saanti ravinnosta ja ravintolisistä ja hyvä D-vitamiinistatus sekä monivitaminiravintolisien käyttö vähentäisivät riskiä, ja vähäinen hedelmien ja ei-tärkkelyspitoisten vihannesten käyttö sekä hemirautaa sisältävät elintarvikkeet lisääisivät riskiä. Punaisella lihalla tarkoitetaan naudaa, sian, lampaan ja vuohen lihaa kasvatetuista eläimistä, lihajalosteilla taas mitä tahansa lihaa, joka on säilötty suolaamalla, savustamalla tai lisääaineilla kuten esimerkiksi nitriitillä. Hemirautaa sisältäviin elintarvikkeisiin kuuluu punainen liha ja lihajalosteet, kala ja siipikarja (1).

Edellä mainituista suolistosyöpien riskiin vaikuttavista elintapatekijöistä lähes kaikki ovat ravintoon liittyviä. Tämä on ymmärrettävää, sillä ravinto vaikuttaa eniten suolen sisällön koostumukseen, mikä taas on keskeinen suolen epiteelisoluihin vaikuttava ympäristötekijä (3). Erityisesti ulosteen nestemäisen osan eli ulosteveden katsotaan olevan se osa suolen sisällöstä, jonka kautta vaikutus välittyy.

Eläinproteiinin korvaamista ruokavaliossa kasviperäisillä proteiininlähteillä on viime vuosina suositeltu monelta taholta. Perusteina on esitetty kasviproteiinin pienemmät ilmastovaikutukset, korvaamisen myötä saavutettavat edulliset terveysvaikutukset varsinkin punaisen lihan käytön vähenemisen myötä sekä osittain myös Suomen parempi proteiiniomavaraisuus (4,5). Tämä tutkimus on osa Suomen Akatemian strategisen tutkimuksen neuvoston rahoittamaa hanketta *Sceno-Prot – Uusia proteiininlähteitä ruokaturvan ja ympäristön hyväksi*, jossa mm. tutkitaan interventioasetelmassa, miten eläinproteiinin osittainen korvaaminen kasviperäisellä proteiinilla vaikuttaa ihmisen terveyteen. Tutkimustietoa kasviproteiinin käytön terveysvaikutuksista tarvitaan, kun pohditaan sen käytön lisäämisen suosittelemista väestötasolla.

Tässä tutkimuksessa hyödynnettiin ulostenäytteitä, jotka oli kerätty erilaisia kasvi- ja eläinperäisten proteiinien suhteellisia osuuksia sisältäviä ruokavalioita noudattavilta henkilöiltä. Tavoitteena oli tutkia solumallin avulla, miten ulostevesinäytteistä eristetty ulostevesi vaikuttaa paksusuolisyöpäsolujen kasvuun, ja mitä mahdolliset erot kertovat kasviproteiinin käytön vaikutuksista suolistosyöpien riskiin.



## 2. Teoreettinen viitekehys

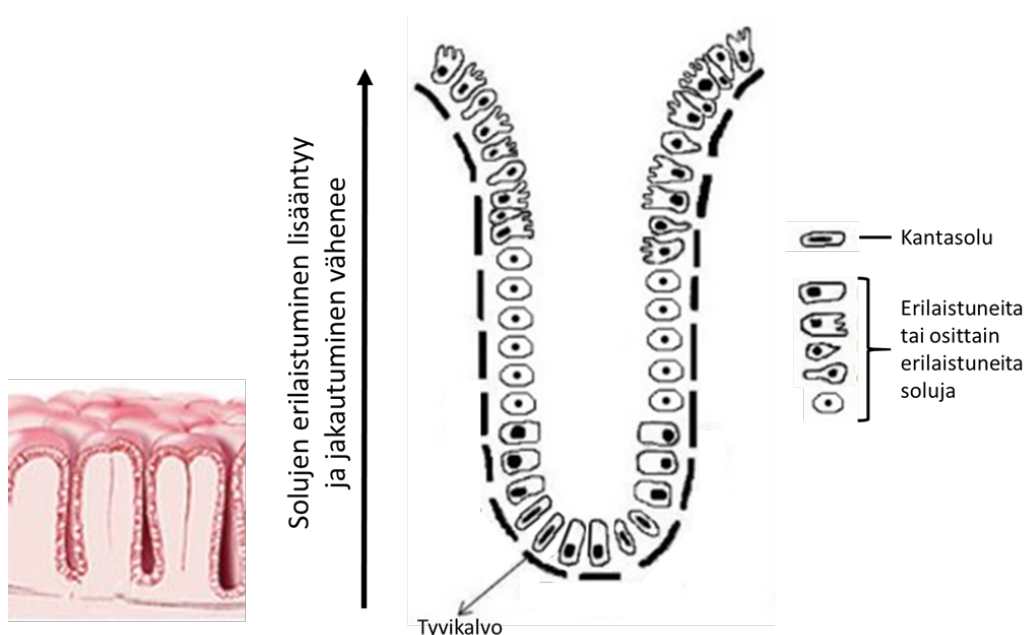
### 2.1. Syöpien yleiset piirteet

Syöpäsoluille ja -kasvaimelle tyypilliset piirteet syntyvät monivaiheisen prosessin kautta, joka kestää usein vuosikymmeniä. Syövän kehittyminen vaatii lukuisia kumuloituvia ja sattumasta johtuvia geneettisiä mutaatioita tai epigeneettisiä muutoksia, jotka aiheuttavat syöpäsoluille ominaisia poikkeamia suolen epiteelisolun toiminnassa (6,7). Normaaleissa soluissa on useita erilaisia genomia suojaavia mekanismeja, jotka toimivat proteiinien välityksellä. Nämä proteiinit mm. sieppaavat ja inaktivoivat mutageenisia molekyylejä, tarkkailevat genomien oikeellisuutta ja korjaavat mahdolliset havaitut virheet, tai jos korjaaminen ei onnistu, estävät solun jakautumisen tai ohjaavat sen apoptoosiin eli hallittuun solukuolemaan (6). Eräänä olennaisena syöpien kehittymisen mahdollistavana piirteenä pidetäänkin mutaatioita, jotka aiheuttavat häiriöitä näiden DNA:ta suojaavien mekanismien toiminnassa, mikä johtaa solun genomien epävakautteen. Jos tällainen solu pääsee jakautumaan, voivat tytärsolut kerryttää yhä lisää mutaatioita, mikä taas lisää todennäköisyyttä yhä uusien syövälle tyypillisten piirteiden syntymiselle ja kumuloitumiselle (6).

Syöpäsoluille ja -kasvaimelle tyypillisiä piirteitä ovat 1) kyky ylläpitää jatkuvan proliferaation eli jakautumisen mahdollistavaa parakriinista tai autokriinista kasvutekijöiden tuotantoa sekä toisaalta 2) kyky vähentää kasvua estävien mekanismien toimintaa sekä näitä stimuloivien signaalien vastaanottoa, 3) solukuolemaan ohjaavien signaalien välttäminen, 4) rajaton jakaantumiskyky, 5) verisuonten uudismuodostuksen stimulointi kasvaimessa sekä 6) tunkeutuminen muualle elimistöön ja etäispesäkkeiden muodostaminen eli metastoituminen (6). Uusimpia ehdokkaita syövän tunnuspiirteiksi ovat 7) solun energiametabolian muuttuminen glykolyyttisemmäksi ja 8) elimistön immuunijärjestelmältä suojautuminen. Myös inflammaatio saattaa olla eräs keskeinen tekijä syövän kehityksen mahdollistajana (6,8).

## 2.2. Suolistosyöpien kehittyminen

Normaali paksusuolen epiteeli koostuu vierekkäin olevista suolikuopakeista eli kryptoista, jotka ovat noin 50 epiteelisolukerrosta syviä (9) (kuva 1). Kryptan pohjaosassa on kantasoluja, jotka jakautumalla ylläpitävät sopivaa solumäärää kudoksessa. Kantasolujen tytärsolut kryptan alaosassa jakautuvat alussa kantasolujakin kiihkeämmin ja kasvattavat epiteelin solumäärää merkittävästi. Jakautumisen aiheuttaman paineen ja myös aktiivisen liikkumisen takia alempana kryptassa olevat solut vaeltavat kryptassa ylöspäin. Ylös kulkeutuessaan solut erilaistuvat vähitellen täysin kypsiksi epiteelisoluiksi ja lopettavat jakautumisen (9).



**Kuva 1.** Normaali paksusuolen epiteelin rakenne. Mukaeltu lähteistä (10,11). Vasemmalla poikkileikkaus normaalista paksusuolen epiteelistä. Oikealla havainnekuva yksittäisestä kryptasta: Kryptan pohjalla olevat kantasolut ylläpitävät kudosta. Kantasolujen tytärsolut jakaantuvat ja liikkuvat ylöspäin kryptassa kohti huippua, ja samalla ne erilaistuvat ja lopettavat jakaantumisen. Lopulta huipulla olevat solut kuolevat apoptoottisesti ja irtoavat.

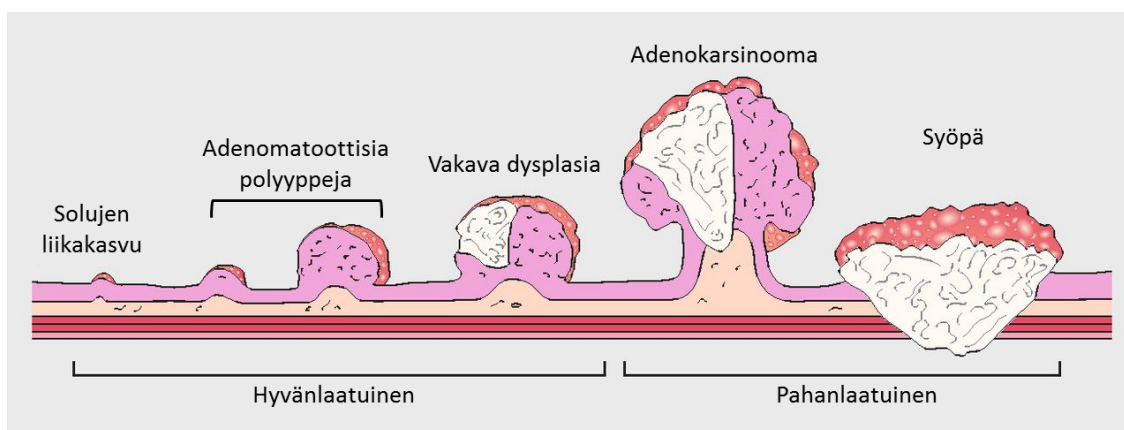
Jotta kryptan ja samalla koko suolen epiteelin rakenne pysyisi normaalina, täytyy soluja jakaantumisen vastapainona myös poistua. Apoptoosi on tärkeä fysiologinen keino säädellä kudosten solumäärää (12). Kryptan huipulla olevien solujen apoptoosi käynnistyy joko solun ulkoisten tai sisäisten apoptoosiin ohjaavien signaalien ansiosta tai kasvutekijäsignaalien puuttumisen takia. Apoptoosiin ohjaavat signaalireitit voivat aktivoitua solun saavuttaessa normaalin elinikänsä, mutta myös esim. DNA:han tulleiden korjaamattomien virheiden takia (12). Solujen uudistu-

minen on yksi tapa varmistaa, että epiteelisolukko pysyy terveenä eikä soluihin kerry mutaatioita suolen luumenin varsin haastavassa ympäristössä. Kuolleet solut irtoavat ja poistuvat ulosteen mukana.

Adenooma-karsinoomasekvenssillä tarkoitetaan kehityskulkua, jossa suolen epiteelisolukko muuntuu asteittain normaalista ensin kasvuhäiriöiseksi epiteeliksi ja lopulta syöpäkasvaimeksi (13,14). Kehitys vaatii useiden sellaisten syöville ja suolistosyövälle tyypillisten geneettisten ja epigeneettisten muutosten syntymistä, valikoitumista ja kasautumista, jotka mm. lisäävät solujen elossa pysymistä ja jakautumista (6,13,14). Mm. suolen sisällön haitalliset yhdisteet voivat aiheuttaa näitä muutoksia. Erityisesti kryptan alaosan kantasoluissa ja nopeasti jakautuvissa tytärsoluissa tapahtuvat muutokset voivat olla alkuna adenooma-karsinoomasekvenssin alkamiselle.

Kryptien huipulla olevia soluja saattaa joissain tilanteissa kuolla normaalia enemmän esimerkiksi jonkun suolessa olevan myrkyllisen yhdisteen vaikutuksesta. Tämä voi lisätä suolistokasvaimen riskiä, koska se samalla aiheuttaa normaalia suurempaa proliferaatiota alempana kryptassa, jotta kuolleet solut saataisiin korvattua uusilla (15). Suurempi proliferaatio altistaa mutaatioille ja mutatoituneiden, erilaistumattomien solujen runsastumiselle.

Varhaisimmat havaittavat histologiset muutokset ovat epiteelisolujen liikakasvu ja siitä johtuvat polyypit (kuva 2). Liikakasvu johtuu solujen proliferaation lisääntymisestä tai apoptoosin vähenemisestä tai molemmista (13). Kun solut säilyvät elossa normaalia pidempään, lisääntyy todennäköisyys yhä uusien mutaatioiden synnylle ja sitä kautta edellä mainittujen yhä uusien syövän ominaispiirteiden kehittymiselle. Vähitellen dysplasia eli solujen kasvuhäiriö vakavoituu, ja epänormaali solukko kasvaa ja muuttuu hyvänlaatuisesta kasvaimesta yhä hankalammin hoidettavaksi syöväksi, joka lopulta voi kyetä lähettämään metastaaseja muualle elimistöön. Metastaattisen syövän tunnuspiirteenä on dysplastisen epiteelin tunkeutuminen muscularis mucosaen läpi submukoosaan (16).



**Kuva 2.** Paksusuolisyövän kehittyminen ja adenooma-karsinoomasekvenssin eteneminen. (17). Tässä tyypillisiä suolen epiteelissä havaittavia muutoksia eri asteisina. Mutaatioiden määrä kasvaimen soluissa lisääntyy vasemmalta oikealle ja samalla kasvain muuttuu hyvänlaatuisesta pahanlaatuiseksi.

### 2.3. Suolistosyöpäriskin biomarkerit ja ravinto

Kroonisten sairauksien – kuten syövän – ja ravinnon välisten yhteyksien tutkimisessa kultaisena standardina pidetään kontrolloituja ja satunnaistettuja interventiotutkimuksia (RCT, engl. randomized controlled trial), joissa vasteena on joko kuolema, sairausdiagnoosi tai jokin validoitu sairauden riskiä kuvaava biomarkkeri eli surrogaattimarkkeri; nämä antavat parasta näyttöä kausaliteetista (3,9,18,19). Syöpädiagnoosi tai -kasvain on kuitenkin huono tutkimusvaste; syövän kehittyminen saattaa kestää vuosikymmeniä, joten tutkimuksista tulisi pitkiä ja kalliita. On myös epäoikeutettua altistaa tutkittavia mahdollisille karsinogeneille.

Valitettavasti myöskään erityisen hyvää riskiä ilmaisevaa surrogaattimarkkeria ei suolistosyövälle ole onnistuttu löytämään (3,7). Polyyppeja pidetään luotettavimpana indikaattorina suolistosyövän riskistä (7), mutta tutkimusvasteena polyypeilla on samoja heikkouksia kuin varsinaisilla syöpäkasvaimilla. Lisäksi kaikki polyypit eivät kehity syöväksi asti, vaan taudin eteneminen vaatii useita muita geneettisiä ja/tai epigeneettisiä muutoksia (20).

Suolistosyöpään johtavat geneettiset ja epigeneettiset muutokset voivat aiheutua esimerkiksi ruoasta suolen sisältöön päätyneistä karsinogeenisistä yhdisteistä tai ruoan yhdisteiden karsinogeenisistä metaboliiteista (3,13). Toisaalta tunnetaan monia ravinnon yhdisteitä, jotka mahdollisesti voisivat ehkäistä syövän syntyä tai

katkaista jo alkaneen epiteelisolujen adenooma-karsinoomasekvenssin (13). Ravinnon eri yhdisteiden vaikutuksesta erilaisten syöpämuutosten kehittymiseen tai niiden ehkäisyyn on olemassa vaihteleva määrä tukea eläin- tai *in vitro* -tutkimuksista (7,13). On voitu esimerkiksi solu- tai eläinmalleja käyttämällä mitata mm. erilaisten ruoan komponenttien tai niiden metaboliittien vaikutuksia epiteelisolujen apoptoosiin, proliferaatioon tai erilaistumiseen, syklo-oksigenaasi-2-entsyymiin (COX-2) toimintaan, kasvaimen angiogeneesiin eli verisuonten uudismuodostukseen, kasvainsolujen metastaasiin, solujen DNA:han tai karsinogeenisten ksenobiottien eliminoimiseen liittyvien biotransformaatioentsyymien toimintaan eli detoksifikaatioon (7).

Polyyyppien lisäksi muita tässä ja seuraavassa luvussa mainittuja potentiaalisia biomarkkereita ravinnon vaikutuksesta suolistosyöpäriskiin ei ole validoitu varsinaisen syöpädiagnoosin suhteen. Tästä syystä niitä ei ainakaan toistaiseksi voi suoraan käyttää arvioitaessa jonkin ruokavalion, ruoka-aineen tai ruoan komponentin suolistosyöpäriskiä moduloivaa vaikutusta (7). Niiden avulla voi kuitenkin sanoa, että jokin ruokavalion komponentti esimerkiksi vähentää altistumista karsinogeeneille, inaktivoi karsinogeenisiä yhdisteitä, vähentää DNA:n vahingoittumista, moduloi syövän ehkäisyssä tärkeiden soluprosessien toimintaa tai inhiboi COX-2-entsyymiä. Tässä mielessä ne siis kertovat muutoksista syövän kehittymiseen läheisesti liittyvissä tekijöissä ja ovat uskottavasti kytköksissä tapahtumiin adenooma-karsinoomasekvenssissä (7).

## **2.4. Ulosteveden käyttö suolistosyöpäriskin arvioinnissa**

### **2.4.1. Uloste ja paksusuolen lumenin olosuhteet**

Suolen sisältö on ilmeinen kiinnostuksen kohde etsittäessä mahdollisia riskimarkkereita (3). Suolen sisällössä on valtava määrä erilaisia kemiallisia yhdisteitä. Osa näistä yhdisteistä tulee suoraan ravinnosta tai ruoansulatuksen muokatessa ravinnon yhdisteitä, ja osa yhdisteistä on peräisin joko elimistön omasta tai suoliston mikrobiston metaboliasta. Lisäksi yhdisteet reagoivat keskenään ja muuntuvat. Erityisesti suolen mikrobisto muokkaa merkittäväällä tavalla suolen sisällön koostumusta; erilainen mikrobiston koostumus saattaa mikrobien metaboliassa tuottaa samastakin ruoasta erilaisia yhdisteitä ja näin vaikuttaa eri tavalla suolistosyöpien

riskiin eri yksilöillä (21–23). Toisaalta ruokavalio vaikuttaa myös mikrobistoon, koska eri mikrobilajit käyttävät ravintonaan erilaisia yhdisteitä. Tällöin erilaiset ruokavaliot saattavat antaa kilpailuedun eri mikrobeille ja suosia toisten lajien lisääntymistä toisten kustannuksella.

Ulosteen katsotaan edustavan varsin hyvin distaalisen paksusuolen sisältöä (3,23,24). Se sisältää useita tunnettuja yhdisteitä, jotka on yhdistetty suolistosyöpien riskin suurenemiseen tai pienenemiseen. Ulosteen syöpäriskiä mahdollisesti suurentavia yhdisteitä ovat mm. sappihapot, rasvahapot, N-nitrosoyhdisteet, heterosykliset amiinit, ammoniakki, yksinkertaiset fenolit ja rikkivety (3,21,25,26). Riskiä voi lisätä myös erilaiset bakteeriperäiset entsyymit, jotka muuttavat maksan vaarattomaksi tekemiä ja sapen mukana suoleen poistettavaksi erittämiä mutageenisia ja karsinogeenisia yhdisteitä takaisin haitalliseen muotoon, esimerkkinä  $\beta$ -glukuronidaasi (7). Riskiä vähentävinä yhdisteinä pidetään mm. polyfenoleita ja niiden metaboliitteja sekä lyhytketjuisia rasvahappoja (SCFA; engl. short chain fatty acids). Myös ulosteen alhaisemman pH:n ajatellaan kertovan pienemmästä riskistä. Kaikkia näitä voidaan myös mitata, ja näin kenties päätellä jotain paksusuolisyöpäriskistä.

#### **2.4.2. Ulostevesi ja ulosteveden biologinen aktiivisuus**

Ulosteen komponenteista erityisen kiinnostuksen kohteena on ollut ulostevesi (3,23). Ulostevedeksi sanotaan ulostenäytteestä sentrifugaamalla erotettua nestefaasia. Sitä voidaan pitää kokonaista ulostetta parempana biomarkkereiden lähteenä; Rafter ym. esittivät tiettävästi ensimmäisenä hypoteesin, jonka mukaan ulostevesi on se ulosteen komponentti, joka varsinaisesti vaikuttaa paksusuolen epiteelin soluihin ja joko lisää tai vähentää suolistosyövän riskiä (3,27). Tämä johtuu siitä, että ulosteen yhdisteiden täytyy olla liukoisessa muodossa – eikä esimerkiksi kiinni bakteerimassassa tai sulamattomassa ruokamatriksissa – jotta ne pääsevät kosketuksiin epiteelisolujen kanssa.

Ulostevedestä voidaan mitata samoja yhdisteitä kuin ulosteesta. Lisäksi sitä voidaan käyttää biologisen aktiivisuuden mittauksissa. Ulosteveden biologisen aktiivisuuden mittauksilla suolistosyöpäriskiä arvioitaessa tarkoitetaan pääasiassa paksusuolen epiteelisolumalleilla tehtäviä sytotoksisuuden, genotoksisuuden, epitee-

lisolukon läpäisevyyden (engl. barrier function) ja geenien ilmentymisen mittauksia, joissa soluja altistetaan ensin ulostevedelle (3,23).

Genotoksisuus on kenties yleisin vaste aktiivisuusmittauksissa. Siinä mitataan ulostevesialtistuksen jälkeen solujen DNA:han mahdollisesti syntyneet vahingot ja mutaatiot (3). Epiteelisolukon läpäisevyysmittauksissa arvioidaan epiteelisolujen välisten tiukkojen soluliitosten pitävyyttä esimerkiksi solukalvon sähköistä vastusta tai väriaineen läpäisevyyttä mittaamalla (15,23). Adenoomissa on havaittu tiukkojen liitosten vuotamista (3).

Yhdisteen sytotoksisuutta voidaan mitata ainakin kahdessa eri koeasetelmassa, joissa molemmissa mitataan jollain soveltuvalla menetelmällä altistuksesta elävänä selvinneiden solujen määrä ja verrataan sitä vastaavalla tavalla kasvatettujen, mutta altistamattomien kontrollisolujen määrään: Akuuttia sytotoksisuutta mitataan tyypillisesti 30–60 minuutin altistusajalla (15). Tämä mittaa lähinnä altisteen lyöttistä aktiivisuutta eli sitä, kuinka altiste hajottaa solukalvoja. Tällöin solu kuolee nekroottisesti. Sytotoksisuus voi johtua myös reseptorivälitteisestä solukuolemasta, minkä takia vakavasti DNA-vaurioinen solu ohjautuu apoptoosiin (15). Tämä kuitenkin voidaan havaita vasta käytettäessä pidempää – esimerkiksi vuorokauden – altistusaikaa. Pidemmän ajan sytotoksisuuden mittaamisesta käytetään tässä termiä viabiliteetin mittaaminen<sup>1</sup>. Viabiliteetin muutos verrattuna kontrollisoluun voi pitkässä altistuksessa aiheutua myös solujen proliferaatioaktiivisuuden muutoksista, jolloin voidaan puhua proliferaatiomittauksesta. Akuutti sytotoksisuus ei myöskään välttämättä korreloi altisteen – tässä tapauksessa ulosteveden – kykyyn indusoida apoptoosia (28).

Koska ulostevesi on kemiallisesti äärimmäisen monimutkainen seos, on yksittäisten yhdisteiden pitoisuuksien analysoinnin perusteella hankala tehdä päätelmiä syöpäriskistä. Biologisen aktiivisuuden mittaukset tarjoavatkin kokonaisvaltaisemman arvion ulosteveden komponenttien yhteisvaikutuksesta paksusuolen epiteelisolukkoon ja sitä kautta riskiin (23).

---

<sup>1</sup> Tosi asiassa molemmissa sytotoksisuusmittauksissa mitataan viabiliteettia eli elävien solujen määrää, mutta termit ovat kirjallisuudessa osin päällekkäisiä, joten selkeyden vuoksi on hyvä tässä erottaa menetelmät toisistaan.

## 2.5. Viabiliteettimittausten käyttö syöpätutkimuksessa

Viabiliteetti-/proliferaatiomittausta käytetään yleisesti syöpälääketutkimuksessa. Se on yksi niistä lukuisista menetelmistä, joiden avulla yritetään alustavasti seuloa syöpälääke-ehdokkaista ne, joilla voisi olla syöpäsolujen tai kasvainten kasvua rajoittavia vaikutuksia – tässä tapauksessa sytotoksisia, proliferaatioita vähentäviä ja apoptoosiin ohjaavia vaikutuksia (29,30). Tämä tehdään tilanteeseen sopivalla syöpäsolulinjalla, jonka soluja altistetaan tutkittavalle yhdisteelle *in vitro*.

Suurin ulkoinen riskitekijä suolistosyöväälle tulee ruokavalion kautta, ja on luontevaa ajatella, että myös syöpää ehkäiseviä tai jopa adenooma-karsinoomasekvenssiä etenemistä hidastavia yhdisteitä voisi joidenkin ruoka-aineiden käytön myötä päätyä paksusuoleen ja näin vaikuttaa syövän syntyyn ja etenemiseen. Viabiliteetin mittaamista onkin käytetty mm. arvioitaessa ruoan komponenttien tai elintarvikkeiden mahdollisia syöpää ehkäiseviä vaikutuksia.

Altistuskokeita paksusuolisyöpäsoluille on tehty erityisesti yksittäisillä aineilla kuten luontaisilla indoli- ja isotiosyanaattiyhdisteillä (31), indoli-3-karbinolilla (32),  $\beta$ -karoteenilla (indusoi apoptoosia) (33), kahveolilla (indusoi apoptoosia) (34), neoklorogeeni- ja kahvihapoilla (indusoivat apoptoosia) (35), klorogeenihappo (36), omenauutteella (37), perunauutteella (38).

Viabiliteettitutkimukset eivät sinänsä kerro, kuolevatko solut altistuksen aikana apoptoottisesti vai nekroottisesti, vaan tämä täytyisi tutkia erikseen, kuten joissain yllä mainituissa tutkimuksissa onkin tehty. On mahdollista, että kokeissa käytetty altiste on niin sytotoksinen, että se aiheuttaa solujen tuhoutumisen, jolloin pienempi viabiliteettilukema olisi jopa epäedullinen tulos. Jos kuitenkin altisteena käytetään ulostevettä, joka on syntynyt normaalin ruoan nauttimisen tuloksena, tällaiset äärimmäiset myrkyllisyystasot lienevät epätodennäköisiä. Tämän selvittämiseksi joissain tutkimuksissa on käytetty myös kontrollisolulinjaa: Zhao ym. (39) altistivat HT-29-paksusuolisyöpäsoluja sekä immortaaleja, mutta muuten normaaleja paksusuolen epiteelistä johdettuja NCM460-soluja antosyaanipitoisilla uutteilla, jotka olivat peräisin viinirypäleestä, mustikasta ja aroniasta. Viabiliteettimittausten jälkeen havaittiin, että uutteet estävät syöpäsolujen kasvua pienemmillä pitoisuuksilla ja lyhyemmässä ajassa kuin kontrollisolujen kasvua. Myös Correa-Betanzo ym. (40) havaitsivat, että marja- ja hedelmäuutteet ja tietyt polyfenolit



vähensivät HT-29-syöpäsolujen kasvua enemmän kuin lähes normaalin CRL 1790 - paksusuolisolulinjan solujen kasvua. Toisaalta Pedersen ym. (41), havaitsivat, että haitallisina pidetyt fenoliyhdisteet fenoli ja dinitrofenoli vähensivät primääristen eli suolibioosiasta peräisin olevien paksusuolisolujen viabiliteettia enemmän kuin HT-29-paksusuolisyöpäsolujen viabiliteettia. Näitä fenoliyhdisteitä syntyy paksusuolen mikrobiston hajottaessa ruoasta peräisin olevia pilkkoutumatta jääneitä ja imeytymättömiä proteiineja tai aminohappoja.

Kontrollisoluja käyttäneiden tutkimusten tuloksiin täytyy suhtautua osin varauksella; vaikka viljelyyn soveltuvat kontrollisoluina käytettävät solut ovat morfologisesti normaaleja eivätkä muodosta kasvaimia, ne ovat silti muuntuneita, jotta ne pystyvät lainkaan jakautumaan solumaljalla (42,43). Primäärisolut sen sijaan eivät jakaudu ja ne kuolevat joka tapauksessa jonkin ajan päästä kasvatusmaljalla. Kontrollisoluilla tehtävistä tutkimuksista saadaan kuitenkin jotain viitteitä siitä, voisiko syöpäsoluilla ja normaaleilla soluilla olla herkkyyseroja reagoinnissa hyödyllisinä tai haitallisina pidettyihin yhdisteisiin ja tätä kautta yhdisteiden syöpää ehkäisevästä tai riskiä lisäävästä potentiaalista.

Viabiliteetin yhteyttä paksusuolisyövän kasvaimien kehittymiseen ei ole tutkittu ihmisillä eikä juuri eläimilläkään, mutta kuten sanottu, surrogaattimarkkerin validoiminen syöpätutkimuksessa on erittäin hankalaa. Yhdessä tutkimuksessa kuitenkin teen polysakkaridit vähensivät sekä paksusuolisyöpäkasvaimien kehittymistä hiirimallissa että syöpäsolujen viabiliteettia hiiren paksusuolisyöpäsolumallissa (44).

Ravintoaltistetta, ulosteveettä ja geno- tai sytotoksisuutta yhdistäviä tutkimuksia on tehty jonkin verran. Sen sijaan viabiliteettia biologisen aktiivisuuden mittarina käyttäneitä tutkimuksia on toistaiseksi tehty vähän. Pari rotilla tehtyä tutkimusta löytyy, jossa rotille on syötetty pakastekuivattua kinkkua (45) tai naudanlihaa (46), ja mitattu ulosteveden vaikutusta viabiliteettiin rotan paksusuolisyöpäsolumallissa. Ihmisillä on tutkittu ainakin vehnänleseuutetta (47) ja porkkana- ja tomaattimehulisää (48) käyttäneiden ulosteveden vaikutuksia viabiliteettiin paksusuolisyöpäsolumallissa. Toistaiseksi julkaisemattomassa tutkimuksessa tutkittiin marjojen vaikutusta viabiliteettiin ruokavaliolla, jossa punaisen lihan määrä oli va-

kioitu (49). Proteiini­lähteiden vaikutusta viabiliteettiin ei ole tutkittu aiemmin lainkaan.

Akuutin sytotoksisuuden ja genotoksisuuden mittauksilla tutkitaan siis lähinnä altisteen haitallisia vaikutuksia. Viabiliteettimittauksessa sen sijaan voidaan myös nähdä, voisiko altisteella olla syöpäprosessia hidastavia tai syövän kehittymistä estäviä vaikutuksia. Tämän takia se eroaa edellä mainituista yleisemmin käytetyistä ulosteveden biologisen aktiivisuuden mitta­usmenetelmistä, ja sillä voisi olla laajemminkin sijaa ravitsemustutkimuksessa.

## **2.6. Proteiini­lähteiden vaikutus suolistosyövän riskiin**

Johtuen luvussa 2.3. mainituista vaikeuksista tehdä RCT-tutkimuksia syövän ravitsemuksellisista riskitekijöistä tämänhetkinen tutkimusnäyttö koostuu lähinnä havainnoivissa tutkimuksissa löydetyistä yhteyksistä sekä niitä tukevista uskottavista oletuksista yhteyksien taustalla vaikuttavista mekanismeista.

### **2.6.1. Havainnoivia tutkimuksia**

Tutkimuksia, joissa olisi tarkasteltu eläinproteiinin korvaamista kasviproteiinilla ja sen vaikutuksia suolistosyöpäriskiin on tehty toistaiseksi vähän; Liao ym. (50) väittävät, että heidän tutkimuksensa on ensimmäinen etenevä kohorttiasetus, jossa tätä korvaavuusvaikutusta mallinnettiin. Tässä suuressa yhdysvaltalaiskohortissa eläinproteiinin korvaaminen kasviproteiini­lähteillä oli yhteydessä pienempään suolistosyöpäriskiin. Tarkasteltaessa proteiini­lähteitä erikseen, yhteys näkyi vain korvattaessa punaisen lihan proteiinia leivän, pastan ja muiden viljatuotteiden proteiinilla.

Joissain aiemmissa tutkimuksissa on kuitenkin tehty myös korvaavuusanalyysyjä. Kahden suuren kohortin aineistossa suurempi kasviproteiinin saanti oli yhteydessä pienempään kokonaiskuolleisuuteen (51). Tämä tosin näkyi vain henkilöillä, joilla oli elämäntapoihin liittyviä riskitekijöitä, kuten ylipaino, tupakointi, runsas alkoholinkäyttö tai vähäinen liikunta. Lisäksi erityisesti lihajalosteista saadun eläinproteiinin korvaaminen kasviproteiinilla näytti yhdistyvän pienempään kokonaiskuolleisuuteen. Proteiini­lähteellä ei vakioinnin jälkeen ollut tilastollisesti merkitsevää yhteyttä syöpäkuolleisuuteen. Japanilaisessa kohortissa suurempi

kasviproteiinin saanti oli yhteydessä pienempään kokonaiskuolleisuuteen, mutta ei syöpäkuolleisuuteen (52). Korvaavuusanalyysien perusteella kuitenkin punaisen lihan ja lihajalosteiden korvaaminen kasviproteiinin lähteillä tai kalalla voisi vähentää kokonais- ja syöpäkuolleisuutta.

Joissain tutkimuksissa on tarkasteltu kokonaisruokavalioita. Paksusuolisyöpädiagnoosin saaneista yhdysvaltalaisista potilaista koostuvaa kohorttia seuraamalla havaittiin, että kasvipainotteinen ja kasviperäisiä proteiinilähteitä suosiva vähähiilihydraattinen ruokavalio oli vahvasti yhteydessä potilaiden pienempään syöpä- ja kokonaiskuolleisuuteen (53). Hollantilaisessa väestökohortissa tutkijat eivät löytäneet merkitsevää eroa paksusuolisyöpäriskissä, kun he vertasivat kasvissyöjiä, kala-kasvissyöjiä ja kerran viikossa lihaa syöviä 6–7 kertaa viikossa lihaa syöviin (54). Etenevistä kohorttitutkimuksista koostuva meta-analyysi ei löytänyt etua täysvegetaarista ruokavaliosta suhteessa suolistosyöpään (55). Sen sijaan semi-vegetaarinen ja peskovegetaarinen ruokavalio yhdistyi pienempään riskiin. Kirjoittajat päättävät, että minkään proteiinilähteen jättäminen kokonaan pois ravinnosta ei olisi terveydelle edullista.

Eläinproteiinin lähteistä lähinnä suurempi punaisen lihan ja lihajalosteiden käyttö näyttävät meta-analyyseissä yhdistyvän suurentuneeseen suolistosyöpäriskiin (56–58) tai paksu- ja peräsuolen adenoomien riskiin (59). Toisaalta kaikki eläinproteiini ei näyttäydä haitallisena; siipikarjan (60) ja kalan (61) käyttö saattaisi meta-analyysien perusteella hieman vähentää riskiä. Punaisen lihan ja varsinkin lihajalosteiden yhteyttä paksusuolisyöpäriskiin pidetäänkin yleensä merkittävänä ja kausaalisuutta vakuuttavana, mihin tulokseen myös WCRF päätyy raportissaan (1). Yhteyden merkittävyyttä tosin myös kyseenalaistetaan. NutriRECS-konsortio julkaisi äskettäin joukon systemaattisia katsauksia ja meta-analyysejä sekä niistä tehdyn yhteenveto-/suositusartikkelin liittyen punaisen lihan ja lihajalosteiden terveysriskeihin (62). Julkaisu herätti kohua ja närkästystä ja provosoi vahvoja reaktioita (63). Huolimatta heidänkin tunnustamasta yhteyden olemassaolosta, he arvioivat mm., että yhteys on heikko, sekoittavien tekijöiden merkitystä yhteyden selittäjänä ei voida vakuuttavasti sulkea pois, absoluuttisen riskin väheneminen lihankulutusta vähennettäessä on hyvin pieni ja tutkimusnäytön laatu ylipäänsä on varsin matala. Kiista näyttää koskevan erityisesti sitä, millä kriteereillä epide-

miologisia tutkimuksia pitäisi ravitsemustieteessä arvioida ja mikä paino niille antaa, kun arvioidaan kokonaisevidenssiä jonkin yhteyden olemassaolosta ja vahvuudesta (64). Mahdollisista kiistoista huolimatta täytyy muistaa, että mikään ei tiettävästi viittaa millään lailla siihen, että ainakaan punainen liha ja lihajalosteet vähentäisivät suolistosyöpäriskiä.

### **2.6.2. Mekanistinen näkökulma**

Kun eläinproteiinia korvataan ruokavaliossa kasviproteiinilla, muuttuu ruokavaliossa moni muukin asia, koska eläin- ja kasviproteiinien lähteet ovat varsin erilaisia koostumukseltaan (4). Kun lihaa, kalaa, maitotuotteita ja munia vaihdetaan palkokasveihin, pähkinöihin ja siemeniin, kuidun saanti tyypillisesti kasvaa, tyydyttyneiden rasvahappojen saanti vähenee ja monityydyttymättömien kasvaa. Myös hemiraudan saanti pienenee, ja joidenkin edullisina pidettyjen fytokeemikaalien kuten polyfenolien saanti kasvanee palkokasvien suuremman käytön myötä (4,65,66). Toisaalta kasviproteiinilähteiden huonompi pilkkoutuvuus ja imeytyvyys saattavat aiheuttaa sen, että suurempi määrä sulamatonta proteiinia päätyy paksusuoleen mikrobien hajotettavaksi, millä voisi hypoteettisesti olla haitallisia-kin vaikutuksia (26,67,68).

On olemassa useita mahdollisia mekanismeja, jotka voisivat selittää havainnoivissa tutkimuksissa löydettyä yhteyttä punaisen lihan ja lihajalosteiden käytön ja suolistosyöpien välillä: Kypsennettäessä lihaa ja prosessoitaessa sitä lihajalosteiksi – varsinkin korkeissa lämpötiloissa paistaen tai grillaten sekä savustettaessa – syntyy helposti heterosyklisiä amiineja (HCA) ja polyaromaattisia hiilivetyjä (PAH), jotka ovat mm. eläinkokeissa todettu karsinogeenisiksi (69–71).

N-nitrosoyhdisteet (NOC) ovat karsinogeenisiä, joita syntyy mm. lihajalosteisiin, joihin on lisätty nitriittiä tai nitraattia (71). NOC:tä muodostuu myös endogeenisesti mahalaukussa nitriiteistä tai nitraateista matalan pH:n takia tai paksusuoleen mikrobitoiminnan seurauksena (70). NOC:t voivat vahingoittaa solujen perimää muodostamalla DNA-addukteja ja näin indusoida syövän syntyä (69,70). Punaisen lihan sisältämä hemirauta voi myös katalysoida NOC:den tuotantoa suolessa (72). Se saattaa myös lisätä lipidien peroksidaatiota ja aiheuttaa siten hapetustressiä (72).

Eläinproteiinilähteistä maitotuotteet ovat sen sijaan elintarvikeryhmä, josta on WCRF:n mukaan on vakuuttavaa näyttöä siitä, että ne todennäköisesti suojaavat paksusuolen syövältä (1). Vaikutus välittyy ainakin osin maitotuotteiden sisältämän kalsiumin kautta, jonka käyttäminen myös ravintolisänä saattaa vähentää riskiä. Kalsium pystyy muodostamaan kasvainten kasvua edistävien vapaiden rasvahappojen ja sekundaaristen sappihappojen kanssa liukenemattomia saippuayhdisteitä, jolloin niiden sytotoksinen vaikutus estyy (71,73). Kalsium myös estää hemin katalysoimaa NOC:den tuotantoa (74). Muita edullisia maidon komponentteja voisivat olla konjugoitu linolihappo (CLA), joka on märehtijöiden pötsissä syntynyt transrasvahappo, tai hapanmaitotuotteiden maitohappobakteerit (71). Eläinproteiinilähteistä myös kala saattaa vähentää riskiä; kalan rasvan n-3-rasvahapot vaikuttavat inhiboimalla COX-2-entsyymiä, jonka arakidonihaposta muodostama prostaglandiini E2 lisää solujen proliferaatiota, vähentää apoptoosia, lisää syöpäsolujen migraatiota ja metastointia sekä indusoi angiogeneesiä (70).

Monesta kasviproteiinilähteestä saatava ravintokuitu todennäköisesti vähentää syöpäriskiä myös WCRF:n mukaan (1). Kuitu nopeuttaa suolen sisällön läpikulku-aikaa ja lisää suolen sisällön massaa. Tällöin altistusaika haitallisille yhdisteille lyhenee, ja yhdisteiden pitoisuudet myös laimenevat (71). Lisäksi kuitu tarjoaa ravintoa suolistobakteereille, joista osa tuottaa lyhytketjuisia rasvahappoja kuitua fermentoidessaan (21,23). Lyhytketjuisista rasvahapoista erityisesti butyraatin arvellaan olevan tärkeä mm. suoliston terveyden kannalta; epiteelisolut käyttävät butyraattia mielellään energian lähteenä, sillä on mahdollisesti anti-inflammatorisia vaikutuksia, ja se auttaa pitämään yllä suolen epiteelin homeostaasia vaikuttamalla epiteelisolujen geeniekspression, solujen erilaistumisen ja apoptoosiin ohjautumisen säätelyyn (21). Joistakin palkokasveista saatavat polyfenolit tai niiden bakteerimetaboliitit voivat ehkäistä suolistosyövän kehittymistä esimerkiksi auttamalla hyödyllisten, suolen suojaamiseen liittyvää limakerrosta ylläpitävien bakteerien kiinnittymistä suolen seinämään tai toimimalla antioksidantteina (75).

### 3. Tutkimuksen tavoitteet

Oletettavasti erilaiset proteiini­lähteet ruokavaliossa vaikuttavat eri tavalla uloste­veden kemialliseen koostumukseen, ja erot ulosteveden koostumuksessa vaikutta­vat todennäköisesti eri tavalla suolistosyöpäriskiin. Tässä työssä on tarkoitus tut­kia, kuinka erilaisia kasvi- ja eläinperäisten proteiinien suhteellisia osuuksia sisäl­ttäviä ruokavalioita noudattaneiden henkilöiden ulostenäytteistä eristetty uloste­vesi vaikuttaa HCA-7-paksusuolisyöpäsolulinjan solujen viabiliteettiin. Lisäksi ana­lysoidaan korreloiko viabiliteetti muiden tunnettujen suolistosyövän riskiin vai­kuttaviin tekijöiden kanssa. Näitä ovat painoindeksi, ulosteveden pH sekä toteutu­neen ruokavalion komponenteista energian, proteiinin, kuidun ja kalsiumin saanti. Työssä tehtävät solukokeet ovat osa ScenoProt -interventiotutkimukseen suunni­tellusta laajemmasta solumalleilla tehtävästä koekokonaisuudesta. Raja­us vain yh­teen solulinjaan on tehty pro gradu -työhön varattujen aikaresurssien puitteissa.



## 4. Aineisto

### 4.1. ScenoProt-interventio

Tutkimuksessa käytettiin ulostenäytteitä, jotka oli kerätty ScenoProt-interventioon osallistuneilta tutkittavilta ennen interventiota sekä sen lopussa. Interventioon hyväksytyjen tuli olla 20–69 vuotiaita, terveitä suomalaisia. Tutkittavien haluttiin edustavan suomalaista väestöä, joista huomattava osa on lievästi tai merkittävästi lihavia. Tästä syystä hyväksyttiin henkilöt painoindeksiltään (BMI; engl. body mass index) 18,5–35 kg/m<sup>2</sup>, jos he muuten täyttivät kriteerit. Poissulokriteereitä olivat tulehduksellinen suolistosairaus, ärtyvän suolen oireyhtymä, keliakia, lääkehoitoa vaativa diabetes, umpieritys- tai rasva-aineenvaihdunnan häiriö, maksa- tai munuaissairaus, syöpäsairaus, jatkuva tai viimeisten kolmen kuukauden aikana tapahtunut antibioottien käyttö, statiinilääkitys, säännöllinen ravintoainevalmisteiden käyttö, kala- tai pähkinäallergia, syömishäiriö, erittäin raskas urheilu, tupakointi, raskaus tai imetys. Intervention aloitti 146 henkilöä.

### 4.2. Tutkimusruokavaliot

Tutkittavat satunnaistettiin yhdelle kolmesta tutkimusruokavaliosta, jota he noudattivat 12 viikkoa. Tavoitteena oli, että ruokavaliot sisältäisivät proteiinia 17 E% eli suomalaisten keskiarvosaannin verran. Ruokavaliossa 1 oli eläin- / kasviproteiinisuhde 70 %/30 % (jatkossa "ELÄIN"), mikä vastaa suomalaisten keskimääräistä proteiininsaannin jakaumaa. Kahdessa muussa ruokavaliossa kasviproteiinin osuutta lisättiin niin, että proteiinisuhteet olivat ruokavaliossa 2 50 %/50 % ("50/50") ja ruokavaliossa 3 30 %/70 % ("KASVI") (Kuva 3). Suurin osa proteiinipitoisista elintarvikkeista kananmunia ja maitotuotteita lukuun ottamatta jaettiin tutkittaville maksutta. Rasvan ja hiilihydraatin saantia ei kontrolloitu. Kalan ja kananmunien määrä oli kaikissa ruokavalioiden yhtä suuri. Ravintolisien käyttö oli kielletty.

 <b>ELÄIN</b>	<b>Eläinproteiini (70 %):</b> Maitotuotteet, liha, kala, munat	<b>Kasviproteiini (30 %):</b> Vilja- tuotteet, peruna, riisi
 <b>50/50</b>	<b>Eläinproteiini (50 %)</b>	<b>Kasviproteiini (50 %):</b> Härkä-papu, kaura, soija (tofu), kvinoa, herne, pähkinät ja sie- menet, viljatuotteet, peruna, riisi
 <b>KASVI</b>	<b>Eläinproteiini (30 %)</b>	<b>Kasviproteiini (70 %):</b> Härkäpapu, kaura, soija (tofu), kvinoa, herne, pähkinät ja siemenet, viljatuotteet, peruna, riisi

**Kuva 3.** Tutkimusruokavalioiden proteiinin lähteet.

Ruokavaliot toteutettiin siten, että niiden energiasisältö vastaisi tutkittavan energiankulutusta, jotta tutkittavien paino pysyisi muuttumattomana. Tutkittavien painoa seurattiin ja he saivat suullista opastusta ruokavalioiden noudattamiseen ja energiansaannin säätämiseen. Ruokavalioiden toteutumista seurattiin ruokapäiväkirjoilla: Tutkittavat täyttivät 3+1 päivän ruokapäiväkirjaa ennen interventiota ja sen lopussa, sekä yhtenä päivänä joka kolmas viikko – yhteensä 11 päivää.

### 4.3. Ulostenäytteiden keräys

Tutkittavat ohjeistettiin ottamaan ulostenäyte yhdeltä ulostuskerralta kahteen näytepurkkiin kolmena päivänä ennen interventioruokavalion aloitusta sekä interventioruokavaliojakson viimeisellä viikolla, jolloin näytepurkkeja tuli ohjeen mukaan toimineilla 12 kpl. Lisäksi he punnitsivat ulosteen määrän ja arvioivat koostumuksen Bristol-asteikolla. Tutkittavat pakastivat näytepurkit välittömästi näytteen otettuaan kotipakastimeen, ja kuljettivat pakastetut näytteet kylmävaraa-  
jien kanssa styroxlaukussa Ravitsemustieteen osastolle, jossa ne siirrettiin syvä-  
jäähäpakkastimeen -70 °C:seen. Tutkittaville jaettu ohje on liitteenä (Liite 1).



#### **4.4. Eettiset kysymykset ja tietoturva**

ScenoProt-interventiotutkimukselle on saatu Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiirin koordinoivan eettisen toimikunnan puoltava lausunto (Dnro 1651/2016).

Tutkittavia rekrytoitiin Helsingin Sanomien ilmoituksen, sähköpostilistojen ja sosiaalisen median kautta. Vastanneet ja seulonnan läpäisseet kutsuttiin informaatioilaisuuteen, jonka jälkeen he saivat harkita allekirjoittavatko suostumusasiakirjan. Suostumusasiakirja palautettiin tutkijoille henkilökohtaisessa tapaamisessa, jossa varmistettiin, että osallistujalla on oikea ja todenmukainen kuva tutkimuksesta. Tutkittavat saivat missä tahansa tutkimuksen vaiheessa keskeyttää tutkimukseen osallistumisen tai peruuttaa suostumuksen syytä ilmoittamatta.

Tutkimusaineistoa käsiteltiin ja säilytettiin luottamuksellisena salassapitovelvollisuutta ja henkilötietolakia noudattaen. Koko projektin henkilökunta oli tietoinen vaitiolovelvollisuudestaan sekä tutkimusaineiston käsittelyyn liittyvistä tietoturva-asioista. Tutkittavilta kerättiin taustatietoina tunnistesteellista aineistoa, joka säilytetään Helsingin yliopiston ravitsemustieteen osastolla. Tutkimusaineistot säilytettiin erillään tutkittavien henkilötiedoista. Tutkimuksessa kerättävä tieto tallennettiin tiedostoon, jossa tietoja käsiteltiin ja analysoitiin koodattuina, eikä niitä yhdistetty henkilötietoihin. Elektroninen tunnistesteellinen aineisto säilytettiin vain tutkimusryhmän käytössä olevalla salasanasuojatulla verkkolevyllä.

## 5. Menetelmät

### 5.1. Ulosteveden eristys

Ulostevedet eristettiin ulostenäytteistä Eläinlääketieteellisen tiedekunnan uloste- ja parasiittilaboratorioissa sekä Ravitsemustieteen osaston tutkimuslaboratoriossa tammi–toukokuussa 2018. Eristämisessä oli mukana tämän opinnäytetyön tekijä, tutkimusavustajana työskennellyt Tuulia Ingman sekä laboranttiharjoittelija Minna Koivikko. Ulostenäytteet otettiin edellisenä päivänä pakastimesta ja laitettiin kannellisessa styrox-laukussa sulamaan kylmiöön lämpötilaan +4 °C. Näytteinä käytettiin kahden eri päivän näytteitä, joista molemmista otettiin yhtä suuri määrä ja laimennettiin puhdistetulla vedellä (MilliQ) 1:1. Vesi-uloste-seos homogenoitiin dispergointilaitteella (T-18 digital Ultra-Turrax, IKA) kaksi minuuttia nopeudella 13–15000 rpm.

Ulostehomogenaattia sentrifugoitiin ultrasentrifuugilla (Optima MAX, Beckman Coulter) kaksi tuntia +4 °C:ssa kierrosluvulla 31000 rpm. Supernatantti eli ulostevesi erotettiin ja siitä mitattiin pH (Accumet AB150, Thermo Fisher Scientific).

Ulostevesi suodatettiin kertakäyttösuodattimilla (Minisart Syringe Filter, Sartorius). Esisuodatus tehtiin 0,45–5,0 µm:n suodattimilla ja viimeinen suodatus 0,22 µm:n suodattimella suoraan 2 ml:n pakastusputkiin, jolloin ulostevedestä tuli steriiliä. Pakastusputket pakastettiin heti suodatuksen jälkeen -70 °C:ssa.

Kirjoittamani yksityiskohtainen työohje on liitteenä (Liite 2).

### 5.2. Solukokeet

#### 5.2.1. Laitteet ja liuokset

Kaikki solukokeet suoritti kirjoittaja Ravitsemustieteen osaston solulaboratoriossa. Loppupisteen solukokeet tehtiin maaliskuussa 2018 ja alkupisteen kokeet syys-lokakuussa 2018. Solujen ja liuosten käsittely tehtiin steriilissä laminaarikaapissa (Biowizard, Kojair) aseptisen työskentelyn periaatteita noudattaen. Soluja kasvatettiin inkubaattorissa (Heracell 150, Thermo Fisher Scientific), jossa lämpötila oli 37 °C ja ilman hiilidioksidipitoisuus 5 %. Soluviljelmiä tarkasteltiin mikroskoopilla (Eclipse TS-100F, Nikon) ja valokuvattiin mikroskooppiin liitetyllä

kameralla (Digital Sight DS-L2, Nikon). Solususpensioiden solutiheys laskettiin automaattisella solulaskurilla (Countess Automated Cell Counter, Invitrogen) ja solut värjättiin laskemista varten trypaaninsinisellä väriaineella (Trypan Blue Stain 0.4%, Invitrogen).

Peruskasvatusliuos (DMEM+) oli DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Lonza BioWhittaker), johon lisättiin 10 % lämpöinaktivoitua vasikan seerumia (FBS Fetal Bovine Serum, Life Technologies Gibco), 1 % L-glutamiiniliuosta (L-glutamine, 200 mM in 0,85 % NaCl Solution, Lonza BioWhittaker) sekä 1 % antibioottiliuosta (PEN-STREP, 10.000 U Penicillin/ml, 10.000 U Streptomycin/ml, Lonza BioWhittaker). Ulosteviesialtistuksissa kasvatusliuos (DMEM1%) oli muuten sama, mutta vasikan seerumia lisättiin vain 1%, koska solujen ei tarvinnut siinä vaiheessa enää jakaantua voimakkaasti.

Soluviljelmien huuhteluun käytettiin PBS-puskuriliuosta (PBS, Phosphate Buffered Saline, 0,0067 M [PO<sub>4</sub>], without Ca and Mg, Lonza BioWhittaker) ja solujen irrottamiseen kasvatuspullon pohjasta trypsiiniliuosta (TRYPsin EDTA, 200 mg/L Versene [EDTA], 170.000 U Trypsin/L, Lonza BioWhittaker).

Solujen määrä ulosteviesialtistuksen jälkeen määritettiin WST-8-reagenssin avulla (Cell Counting Kit-8 [CCK-8], Sigma-Aldrich), josta soluaineenvaihdunnassa syntyvän värin voimakkuus mitattiin kuoppalevynlukijalla (Multiskan FC Microplate Photometer, Thermo Scientific).

Kaikki liuokset, ja reagenssit, joita käytettiin solujen kanssa, pyrittiin lämmittämään lämpötilaan +37 °C. Käytännössä nestemäärät olivat ulosteviesialtistuspipetoiteja tehdessä niin pieniä, että liuokset ehtivät tässä jäähtyä huoneen lämpötilaan.

Kirjoittamani työohje solukokeisiin on liitteenä (Liite 3).

### **5.2.2. Solujen sulatus, alkukasvatus ja viljelmän ylläpito**

Ulosteviesialtistuskokeessa käytettiin HCA-7-paksusuolisyöpäsolulinjan soluja. Solulinja on lähtöisin 58-vuotiaan naispotilaan adenokarsinoomasta, joka oli kohtalaisesti erilaistunut ja määritetty Dukesin asteikolla luokkaan B (76–78).

Nestetyyppisäiliössä säilytettyä, yhden millilitran solususpensiota sisältävä ampulli sulatettiin noin 37-asteisessa vesihauteessa noin minuutin ajan. Suspensio pipetoi-

tiin T25-kasvatuspulloon, jonne oli ensin lisätty 9 ml DMEM+-kasvatusliuosta. Kasvatuspullo siirrettiin inkubaattoriin, jossa elävät solut kiinnittyivät kasvatuspullon pohjaan. Kasvatusliuos vaihdettiin uuteen kahtena seuraavana päivänä kasvun nopeuttamiseksi, jolloin saatiin samalla poistettua pohjasta irronneet kuolleet solut. Kolmantena päivänä istutuksen jälkeen solut siirrettiin suurempaan T75-kasvatuspulloon. Siirto tapahtui poistamalla ensin vanha kasvatusliuos ja huuhtelemalla pulloa kaksi kertaa 3 ml:lla PBS-puskuriliuosta kasvatusliuoksen jäämien ja soluliitoksia vakauttavien kalsiumionien poistamiseksi, minkä jälkeen lisättiin 2 ml trypsiiniliuosta ja siirrettiin pullo inkubaattoriin. Trypsiinin annettiin vaikuttaa noin 10 minuuttia tai kunnes mikroskoopilla tarkasteltuna solut olivat irronneet pullon pohjasta. Trypsiinin inaktivoimiseksi lisättiin 8 ml kasvatusliuosta (DMEM+) ja solususpensiota purskuteltiin pipetillä, jotta mahdolliset solupaakut hajoaisivat. Suspensio pipetoitiin T75-pulloon ja lisättiin 5 ml DMEM+:aa, jotta kokonaisnestemäärä pullossa olisi 15 ml. Kasvatuspullo siirrettiin lopuksi inkubaattoriin.

Solut pyrittiin jakamaan uusiin pulloihin tai käyttämään altistuskokeisiin, kun solujen peittävyys eli konfluenssi oli 70-90 % kasvatuspullon pohjasta. Solujen irrotus T75-pullostä näissä vaiheissa tapahtui edellä kuvatulla tavalla, mutta trypsiiniä käytettiin 2,5–3 ml ja DMEM+:aa trypsiinin inaktivoimiseksi vastaavasti 7–7,5 ml, jolloin irrotetut solut sisältävän solususpension määräksi tuli 10 ml. Istutustiheys uusiin T75-pulloihin oli 1–4 ml suspensiota 15 ml:n kokonaisnestemäärästä, ja se vaihteli sen mukaan, kuinka nopeasti haluttiin saada soluja kokeita varten.

### **5.2.3. Solujen ulostevesialtistus ja viabiliteetin mitta**

#### *Kuoppalevyjen valmistelu*

Ulostevesialtistuskokeita varten kasvatuspullostä edellä kuvatulla tavalla irrotetun solususpension solutiheys määritettiin sekoittamalla 100 µl suspensiota ja 100 µl trypan blue -väriainetta solujen värjäämiseksi, pipetoimalla seos solulaskentalavyn kahteen kammioon, laskemalla tiheys molemmista kammioista solulaskentalaitteella ja laskemalla näistä keskiarvo. Tämän jälkeen suspensio laimennettiin sopivaksi lisäämällä DMEM+:aa. HCA-7-soluilla käytettiin solutiheyttä  $2 \times 10^5$  solua/ml.

Altistuskokeet tehtiin 96-kaivoisella kuoppalevyllä, jossa oli kahdeksan riviä (A–H) ja 12 saraketta (1–12) (Liite 3, kuoppalevykartta). Laimennettua solususpensiota

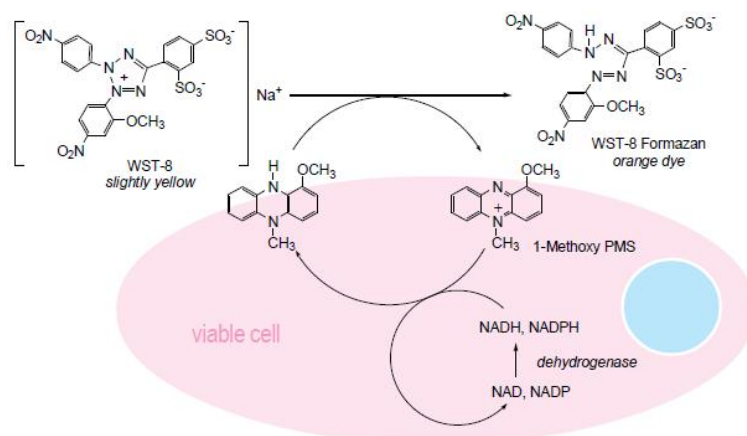
pipetoitiin 100 µl kaikille kuoppalevyn riveille sarakkeisiin 1–9, jolloin yhteen kuoppaan tuli soluja  $2 \times 10^4$  kpl. Levyt siirrettiin inkubaattoriin, jossa solujen annettiin kiinnittyä kuoppien pohjaan ja lisääntyä noin vuorokauden ajan.

#### *Ulostevesinäytteiden pipetointi kuoppalevylle*

Jokaisesta ulostevesinäytteestä tehtiin kolme laimennosta (10 %, 20 % ja 30 %) DMEM1%-kasvatusliuokseen. Vanha kasvatusliuos (DMEM+) poistettiin kuopasta pipetillä, minkä jälkeen laimennettua näytettä pipetoitiin kuoppaan 100 µl. Yhdelle levylle mahtui seitsemän näytettä, ja yksi näyte vei levyltä yhden rivin (rivit A–G). Eri ruokavalioryhmiin kuuluvien henkilöiden näytteet sijoitettiin levyille niin, että kaikilla levyillä oli näytteitä tasaisesti jokaisesta ryhmästä; näin vähennettiin levyjen välisten pipetointipoikkeamien vaikutusta ryhmien välisiin eroihin. Lisäksi näytteiden järjestyksen kuoppalevylle oli laatinut eri henkilö, jolloin koe oli käytännössä sokkoutettu. Sarakkeilla 1–3 tehtiin kolme rinnakkaista koetta 10 %:n laimennoksella, sarakkeilla 4–6 20 % laimennoksella ja sarakkeilla 7–9 30 %:n laimennoksella. Sarakkeissa 10–12 testattiin ulostevesilaimennosten ja WST-8-reagenssin interaktiota ilman soluja, jolloin yhteen kuoppaan tuli yksi laimennos yhdestä näytteestä. Rivi H oli kontrollirivi, jossa sekä solullisiin kuoppiin H1–H9, että soluttomiin kuoppiin H10 ja H11 pipetoitiin pelkkää DMEM1%-kasvatusliuosta 100 µl. H12 jäi tyhjäksi. Näytteiden pipetoinnin jälkeen levy siirrettiin jälleen inkubaattoriin 24 tunniksi.

#### *Viabiliteetin mittaus*

Solujen viabiliteetti mitattiin kolorimetrisesti WST-8-menetelmällä (79–81). Tässä menetelmässä kuoppalevyn kuoppiin lisätään WST-8-reagenssia (Water Soluble Tetrazolium Salt eli 2-(2-metoksi-4-nitrofenyyli)-3-(4-nitrofenyyli)-5-(2,4-disulfophenyyli)-2H tetrazolium, mononatriumsuola). Reagenssista syntyy elävien solujen metaboliassa voimakkaan oranssia formazan-väriainetta (kuva 4), jonka määrä voidaan mitata kolorimetrisesti kuoppalevynlukijalla absorbanssilla 450 nm. Mittauksesta saatu absorbanssilukema on suoraan verrannollinen elävien solujen määrään(81).



**Kuva 4.** WST-8-reagenssin muuttuminen formazaniksi elävän solun aineenvaihdunnassa (82)

Tasan vuorokauden kuluttua ulostevesinäytteiden pipetoinnista tehtiin absorbanssin nollamittaus, jolla saatiin selville kasvatusliuoksen ja ulostevesinäytteiden värin aiheuttama tausta-absorbanssi. Heti tämän jälkeen jokaiseen kuoppaan pipetoitiin 10  $\mu\text{l}$  WST-8-reagenssia ja levy siirrettiin inkubaattoriin. Neljän tunnin inkuboinnin jälkeen absorbanssi mitattiin uudestaan, jolloin saatiin selville syntyneen formazanin määrä – ja näin ollen myös elävien solujen määrä sarakkeissa 1–9 – vähentämällä tuloksesta nollamittauksen absorbanssi. Tästä eteenpäin ”absorbanssi” tarkoittaa arvoa, josta on vähennetty nollamittauksen absorbanssi.

Koska jokaisesta laimennoksesta tehtiin kolme rinnakkaista näytettä (kuopat A1–G9), laskettiin näistä keskiarvo. Jos kuitenkin rinnakkaisten absorbanssilukemien suurin tai pienin arvo poikkesi keskimmäisestä enemmän kuin 15 %, sitä ei otettu huomioon keskiarvoa laskettaessa. Mittaus tehtiin ulostevesinäytteellä uudestaan, jos kumpikin ääriarvo poikkesi mediaanista yli 15 %. Myös kontrollisolujen (kuopat H1–H9) absorbanseista laskettiin keskiarvo ja sovellettiin 15 %:n sääntöä.

Viabiliteetilukema (%) saatiin jakamalla kunkin näytteen kunkin laimennoksen absorbanssien keskiarvo saman levyn kontrollisolukuoppien absorbanssien keskiarvolla ja kertomalla tämä sadalla.

Ingman (49) esitti gradussaan hypoteesin, että ulostevedellä voisi olla itsenäistä vaikutusta WST-8-reagenssin pelkistymiseen formazaniksi ilman solujen läsnäoloa. Hän myös alustavasti testasi interaktiota ja havaitsi siitä viitteitä. Tästä syystä interaktiota testattiin tässä kokeessa laajemmin kaikilla näytteillä: Soluttomista

sarakkeista 10–12 saatiin jokaisen näytteen jokaisen laimennoksen interaktioabsorbanssi. Näiden avulla laskettiin soluille toinen viabiliteettilukema (%) vähentämällä edellä mainitusta solullisten kuoppien absorbanssien keskiarvosta interaktioabsorbanssi ja suhteuttamalla tämä erotus kontrollisolujen absorbanssiin.

### **5.3. Tilastolliset analyysit**

Tilastolliset analyysit tehtiin IBS SPSS Statistics -ohjelmalla (julkaisu 25.0.0.1). Varsinaisena tilastollisena mallina käytettiin kovarianssianalyysia (ANCOVA), jossa kovariaatiksi otettiin alkupisteen viabiliteetti. Ruokavalioryhmien välisten alku- ja loppupisteiden viabiliteettierojen sekä ryhmien viabiliteettien sisäisten muutosten välisten erojen tilastollista merkitsevyyttä testattiin aluksi yksisuuntaisella varianssianalyysilla (ANOVA). Vertailtaessa post hoc -analyysissä ryhmien keskinäisiä eroja käytettiin Bonferroni- korjausta. Korrelaatioiden tarkastelussa käytettiin Pearsonin korrelaatiotestiä. Tilastollisen merkitsevyyden rajana pidettiin p-arvoa 0,05.

ScenoProt-interventiolle tehtiin aiempien aineistojen pohjalta voimalaskelma, joka perustui paastoverensokeriin ja ulosteen hemiperäisten typpiyhdisteiden pitoisuuteen. Laskelman perusteella 50 tutkittavaa / ryhmä riittäisi osoittamaan muutoksen ( $p < 0,05$ ) näissä tutkimusvasteissa (tilastollinen voima 0,80).

## 6. Tulokset

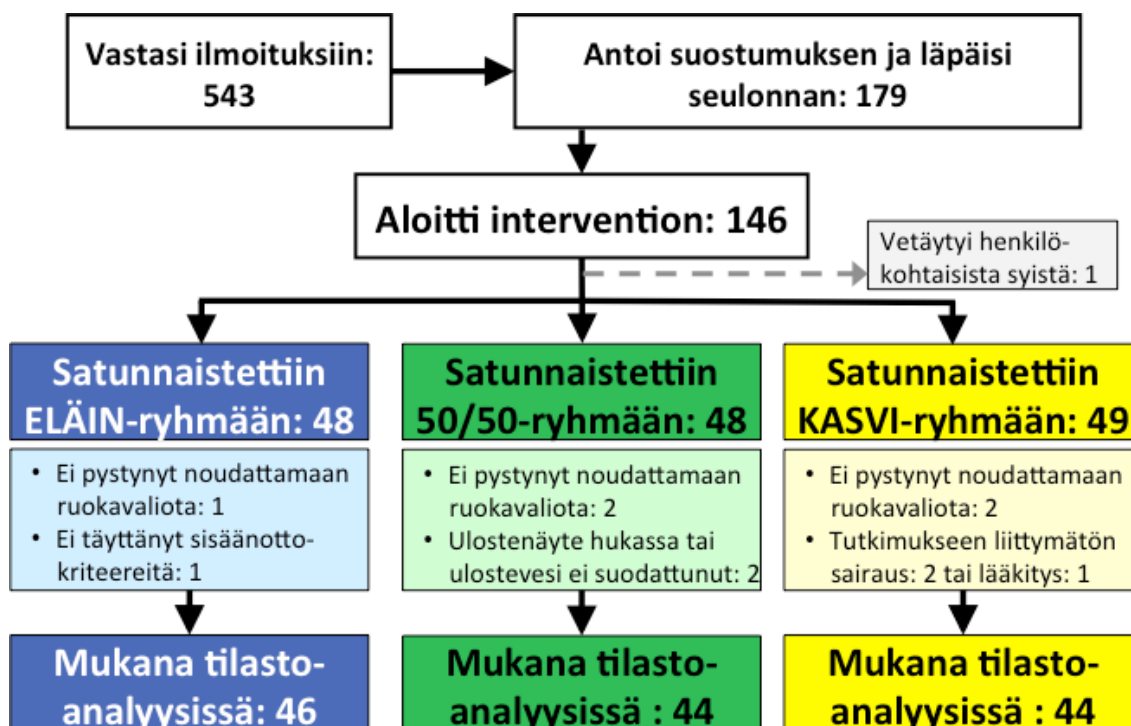
### 6.1. Taustatiedot

Tutkittavien taustatiedot, energian, energiaravintoaineiden, proteiinin ja kuidun (83) sekä kalsiumin (84) saannit on julkaistu aiemmassa tutkimusartikkelissa ja pro gradu -työssä. Seuraavassa esitän tämän työn kannalta olennaiset tulokset, joiden yhteyttä tarkasteltiin tässä työssä mitattuun viabiliteettiin.

#### 6.1.1. Tutkittavat ja tutkimuksen kulku

Koko 12 viikon intervention loppuun asti pysyi mukana yhteensä 136 tutkittavaa, joista 107 oli naisia ja 29 miehiä. Yhdeksän jättäytyi pois intervention aikana ja lisäksi kahden tutkittavan ulostenäytteistä ei saatu eristettyä ulosteveettä, joten ulostevesinäyte saatiin 134 henkilöltä (kuva 5).

Tutkittavien keski-ikä oli 48 vuotta, suurimmalla osalla oli korkeakoulututkinto (57 %) ja he olivat enimmäkseen työssä (60 %) tai eläkkeellä (19 %). Tutkittavat harrastivat keskiraskasta liikuntaa keskimäärin kolme kertaa viikossa ja BMI oli keskimäärin 24,8 kg/m<sup>2</sup>. Interventoryhmien välillä ei ollut eroja missään mitatuissa taustamuuttujissa, eikä BMI:ssä ollut eroja myöskään loppupisteessä (83).



Kuva 5. Tutkimuksen kulku.



### 6.1.2. Ravintoaineiden saanti

Tutkittavien energian, proteiinin, kuidun (83) ja kalsiumin (84) saannissa ei ollut eroja enne intervention alkua ( $p > 0,05$ ). Saannit olivat näissä keskimäärin ravitsemussuositusten mukaisia ja proteiininlähteet olivat 62,4 % eläinperäisiä ja 37,6 % kasvipäisiä (83).

Intervention lopussa ei energiansaannissa eikä rasvan ja hiilihydraattien kokonaissaannissa ollut eroja (83). Proteiinin saannissa KASVI-ryhmä ( $15,2 \pm 2,0$  E%; keskiarvo  $\pm$  keskihajonta) erosi sekä ELÄIN- ( $18,2 \pm 3,1$  E%;  $p < 0,001$ ) että 50/50-ryhmästä ( $16,9 \pm 2,2$  E%;  $p = 0,002$ ), eikä siis aivan yltänyt 17 E%:n tavoitteeseen. ELÄIN- ja 50/50-ryhmät eivät eronneet merkitsevästi proteiinin saannin suhteen. Toteutuneet eläin-/kasviproteiinisuhteet olivat ELÄIN-ryhmällä 68 %/32 %, 50/50-ryhmällä 52 %/48 % ja KASVI-ryhmällä 26,4 %/73,6 %.

Kuidun vuorokausisaannissa oli eroja tutkimuksen lopussa niin, että ELÄIN-ryhmässä saanti oli pienempää ( $28,9 \pm 13,1$  g) verrattuna 50/50- ( $34,7 \pm 10,7$  g;  $p < 0,001$ ) ja KASVI-ryhmiin ( $37,0 \pm 7,0$  g;  $p = 0,012$ ) (83). 50/50- ja KASVI-ryhmät eivät eronneet merkitsevästi toisistaan.

Kalsiumin vuorokausisaanti loppupisteessä oli runsaampaa ELÄIN-ryhmässä ( $1184 \pm 319$  mg) verrattuna sekä 50/50-ryhmään ( $922 \pm 314$ ;  $p < 0,001$ ) että KASVI-ryhmään ( $840 \pm 229$ ;  $p < 0,001$ ) (84). 50/50- ja KASVI-ryhmän välillä ei ollut merkitsevää eroa.

## 6.2. Ruokavalioryhmän vaikutus HCA-7-solujen viabiliteettiin

Kaikkiaan 134 tutkittavalta saatiin eristettyä ulostevesinäyte. Loppupisteen varianssianalyysissä tilastollisesti merkitseviä eroja ryhmien välillä näkyi ulostevesipitoisuuksilla 20 ja 30 til-%, mutta satunnaistamisesta huolimatta alkupisteessä oli merkitseviä eroja kaikilla pitoisuuksilla (taulukko 1).

Kun alkupiste huomioitiin ottamalla kovarianssianalyysissä (ANCOVA) kovariaattiksi alkupisteen viabiliteetti, löytyi ryhmien välillä eroja pitoisuudella 30 til-%. Post hoc -analyysissä KASVI- ja ELÄIN-ryhmien sekä KASVI- ja 50/50-ryhmien välillä oli merkitsevä ero niin, että KASVI-ryhmällä viabiliteetti oli selvästi pienempi

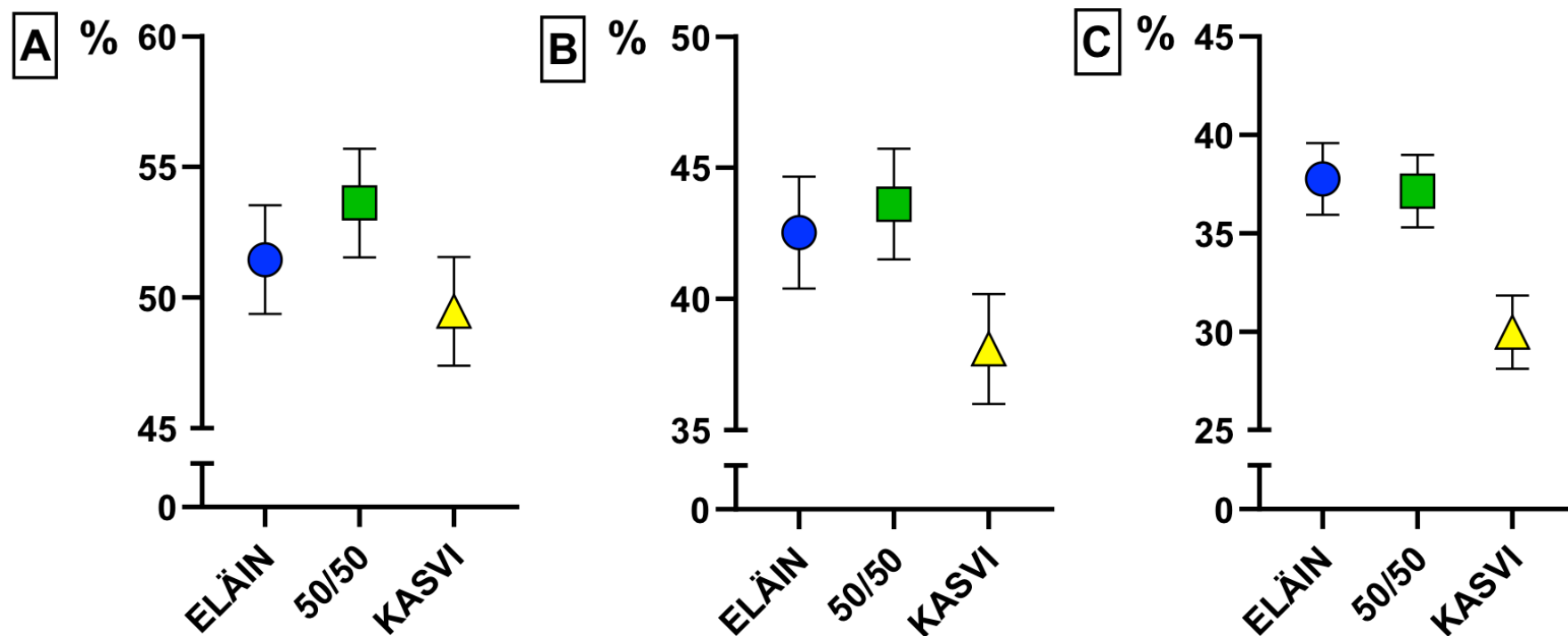
kuin ELÄIN- ja 50/50-ryhmillä (kuva 6.C.). Tarkat kovariaattikorjatut keskiarvoestimaatit näkyvät taulukosta 1.

Viabiliteetti oli suurempi loppupisteessä verrattuna alkupisteeseen kaikilla pitoisuuksilla sekä kokonaisuutena ( $p < 0,00001$ ), että ryhmittäin ( $p \leq 0,011$ ) tarkasteltuna (taulukko 1.).

**Taulukko 1.** Ihmisen HCA-7 paksusuolisyöpäsolulinjan solujen viabiliteetit (%) alku- ja loppupisteissä, viabiliteettien muutos (%-yksikköä) sekä loppupisteen viabiliteettien kovariaattikorjatut keskiarvoestimaatit (% , kovariaattina alkupisteen viabiliteetit) eri ulostevesipitoisuuksilla ruokavalioryhmittäin

Ulostevesipitoisuus		Interventioryhmä (N)			p (ANOVA)
		ELÄIN (46)	50/50 (44)	KASVI (43-44)	
		Viabiliteetti ja viabiliteetin muutos $\pm$ keskihajonta			
10 til-%	Alku	49,1 $\pm$ 15,3	40,7 $\pm$ 12,1	41,3 $\pm$ 11,6	0,004
	Loppu	55,3 $\pm$ 18,0	51,4 $\pm$ 17,0	47,7 $\pm$ 14,7	0,099
	Muutos	6,2 $\pm$ 15,9	10,7 $\pm$ 14,3	6,4 $\pm$ 11,7	0,244
20 til-%	Alku	34,1 $\pm$ 11,5	25,8 $\pm$ 8,6	26,5 $\pm$ 8,7	< 0,0001
	Loppu	45,8 $\pm$ 16,5	41,7 $\pm$ 15,0	36,6 $\pm$ 13,3	0,017
	Muutos	11,7 $\pm$ 14,3	15,9 $\pm$ 15,7	10,1 $\pm$ 12,5	0,145
30 til-%	Alku	26,0 $\pm$ 9,8	22,2 $\pm$ 6,9	22,4 $\pm$ 7,6	0,046
	Loppu	39,1 $\pm$ 16,0	36,4 $\pm$ 11,6	29,3 $\pm$ 10,2	0,0015
	Muutos	13,1 $\pm$ 14,5	14,3 $\pm$ 11,4	7,1 $\pm$ 11,9	0,022
		Loppupisteen viabiliteetin kovariaattikorjattu keskiarvoestimaatti $\pm$ keskivirhe			p (ANCOVA)
10 til-%		51,5 $\pm$ 2,1	53,6 $\pm$ 2,1	49,5 $\pm$ 2,1	0,369
20 til-%		42,5 $\pm$ 2,1	43,6 $\pm$ 2,1	38,1 $\pm$ 2,1	0,143
30 til-%		37,8 $\pm$ 1,8(a)	37,1 $\pm$ 1,8(a)	30,0 $\pm$ 1,9(b)	0,005*

(a), (b) ja (c): Tulokset, joissa on eri kirjain, eroavat toisistaan merkitsevästi. Ryhmien väliset keskinäiset vertailut Bonferroni-korjauksella: \*KASVI vs ELÄIN:  $p = 0,011$ ; KASVI vs 50/50:  $p = 0,021$



**Kuva 6.** Viabiliteetin kovariaattkorjatut keskiarvoestimaatit (%) interventorioryhmittäin eri ulostevesipitoisuuksissa. Janat näyttävät keskiarvon keskivirheen.

**A:** Ulostevettä 10 til-%. **B:** Ulostevettä 20 til-%. **C:** Ulostevettä 30 til-%.

Tilastollisesti merkitseviä eroja ryhmien välillä oli ulostevesipitoisuudella 30 til-% (C.) (ANCOVA  $p = 0,005$ ). KASVI-ryhmä eroaa ELÄIN- ( $p = 0,011$ , Bonferroni-korjaus) ja 50/50-ryhmistä ( $p = 0,021$ )

**ELÄIN:** ruokavaliossa 70 % eläinproteiinia ja 30 % kasviproteiinia kokonaisproteiininsaannista; **50/50:** 50 % eläinproteiinia ja 50 % kasviproteiinia;

**KASVI:** 30 % eläinproteiinia ja 70 % kasviproteiinia.

### 6.3. Ulosteveden pH

Ulosteveden pH:ssa löytyi kovarianssianalyysissa tilastollisesti merkitseviä eroja ryhmien välillä (taulukko 2). pH oli korkein ELÄIN-ryhmällä ja matalin KASVI-ryhmällä, ja ryhmien välisessä keskinäisessä vertailussa merkitsevä ero ( $p = 0,001$ ) löytyi näiden kahden ryhmän väliltä.

**Taulukko 2.** Ulosteveden pH alkupiste- ja loppupisteissä, pH:n muutos sekä pH:n kovariaattikorjatut keskiarvoestimaatit (kovariaattina alkupisteen pH) ruokavalioryhmittäin

	Interventoryhmä (N)			p (ANOVA)
	ELÄIN (46)	50/50 (44)	KASVI (44)	
	pH alkupiste- ja loppupisteissä sekä muutos $\pm$ keskihajonta			p (ANOVA)
Alkupiste	6,92 $\pm$ 0,36	6,82 $\pm$ 0,37	6,91 $\pm$ 0,33	0,274
Loppupiste	6,83 $\pm$ 0,34	6,69 $\pm$ 0,36	6,59 $\pm$ 0,29	0,004
Muutos	-0,103 $\pm$ 0,337	-0,128 $\pm$ 0,442	-0,321 $\pm$ 0,302	0,010
	Loppupisteen pH:n kovariaattikorjattu keskiarvoestimaatti $\pm$ keskivirhe			p (ANCOVA)
	6,81 $\pm$ 0,04(a)	6,72 $\pm$ 0,05(a,b)	6,58 $\pm$ 0,05(b)	0,002*

(a), (b) ja (c): Tulokset, joissa on eri kirjain, eroavat toisistaan merkitsevästi. Ryhmien väliset keskinäiset vertailut Bonferroni-korjauksella: \*ELÄIN vs KASVI:  $p=0,001$

### 6.4. Viabiliteetin, pH:n ja ravintotekijöiden välisiä yhteyksiä

Alkupisteessä jäivät korrelaatiot tutkimuksen päätuloksen eli viabiliteetin kanssa melko heikoiksi; Pearsonin korrelaatiokerroin R oli kaikissa alle 0,3 (taulukko 3). Vahvimmin viabiliteetin kanssa tilastollisesti merkitsevästi ( $p < 0,05$ ) korreloi energian-, kalsiumin- ja proteiinin saanti (g), joissa merkitsevä korrelaatio löytyi kaikilla ulosteveden pitoisuuksilla. BMI ja kuidun saanti korreloivat heikommin niin, että korrelaatio oli merkitsevä vain yhdellä laimennoksella.

Loppupisteessä viabiliteetin kanssa korreloi vahvimmin BMI kaikilla pitoisuuksilla ja pH kahdella pitoisuudella (20 til-% ja 30 til-%). Korrelaatiot energian- ja kalsiuminsaannin kanssa hävisivät. Proteiinin saannin korrelaatio heikkeni ja näkyi enää pitoisuuksilla 10 til-% ja 20 til-%, mutta nyt sekä painossa mitattuna että myös energiaan suhteutettuna.

Kaikki korrelaatiot viabiliteetin kanssa olivat positiivisia.

**Taulukko 3.** Viabiliteetin, BMI:n, ravintotekijöiden ja ulosteveden pH:n välisiä korrelaatioita

Ulostevesi- pitoisuus (til-%)		Alkupiste				Loppupiste			
		Viabiliteetti			pH	Viabiliteetti			pH
		10	20	30		10	20	30	
<b>BMI</b>	<b>R</b>	0,163	<b>,182*</b>	0,159	-0,098	<b>,210*</b>	<b>,366**</b>	<b>,319**</b>	-0,071
	<b>p</b>	0,060	0,035	0,066	0,258	0,015	0,000	0,000	0,415
<b>pH</b>	<b>R</b>	0,150	<b>,222**</b>	0,145	1	0,130	<b>,204*</b>	<b>,249**</b>	1
	<b>p</b>	0,083	0,010	0,095		0,134	0,018	0,004	
<b>Energia</b>	<b>R</b>	<b>,254**</b>	<b>,206*</b>	<b>,184*</b>	-0,096	0,094	0,021	0,025	<b>-,179*</b>
	<b>p</b>	0,003	0,018	0,034	0,273	0,280	0,811	0,777	0,039
<b>Proteiini (g)</b>	<b>R</b>	<b>,299**</b>	<b>,261**</b>	<b>,176*</b>	-0,058	<b>,199*</b>	0,098	<b>,181*</b>	-0,002
	<b>p</b>	0,000	0,002	0,043	0,511	0,022	0,263	0,038	0,979
<b>Proteiini (E%)</b>	<b>R</b>	0,144	0,153	0,064	-0,005	<b>,179*</b>	0,110	<b>,236**</b>	<b>,183*</b>
	<b>p</b>	0,100	0,079	0,467	0,955	0,039	0,207	0,007	0,035
<b>Kalsium</b>	<b>R</b>	<b>,284**</b>	<b>,211*</b>	<b>,185*</b>	0,036	0,168	0,121	0,154	<b>,180*</b>
	<b>p</b>	0,001	0,015	0,034	0,681	0,053	0,164	0,078	0,038
<b>Kuitu (g)</b>	<b>R</b>	0,166	0,139	<b>,192*</b>	<b>-,190*</b>	0,001	-0,127	-0,052	<b>-,233**</b>
	<b>p</b>	0,058	0,111	0,028	0,029	0,994	0,146	0,551	0,007

R: Pearsonin korrelaatiokerroin; \*: p &lt; 0,05; \*\*: p &lt; 0,01

## 6.5. Ulosteveden ja WST-8-reagenssin välisen interaktion vähentämisen vaikutus tuloksiin

Kun viabiliteettilukema laskettiin vähentämällä ensin soluttomissa ulostevesinäytekupissa mitattu interaktioabsorbanssi kolmen solullisen rinnakkaisnäytekuopan absorbanssien keskiarvosta, erot ryhmien välillä säilyivät alkupisteen viabiliteeteissa, mutta loppupisteessä merkitsevä ero jäi vain 30 til-% pitoisuuden kohdalle (taulukko 4). Kovarianssianalyysissä ero säilyi pitoisuudella 30 til-%, mutta ryhmien välisessä keskinäisessä vertailussa ero jäi vain 50/50-ryhmän ja KASVI-ryhmän välille.

**Taulukko 4.** Ihmisen HCA-7 paksusuolisyöpäsolulinjan solujen viabiliteetit (%) *WST-8-reagenssin ja ulosteveden välinen interaktioabsorbanssi vähennettynä* alku- ja loppupisteissä, viabiliteettien muutos (%-yksikköä) sekä loppupisteen viabiliteettien kovariaattikorjatut keskiarvoestimaatit (% , kovariaattina alkupisteen viabiliteetit) eri ulostevesipitoisuuksilla ruokavalioryhmittäin

Ulostevesi-pitoisuus		Interventoriyhmä (N)			p (ANOVA)
		ELÄIN (46)	50/50 (44)	KASVI (43-44)	
		Viabiliteetti ja viabiliteetin muutos ± keskihajonta			
10 til-%	Alkupiste	42,5 ± 15,6	34,4 ± 11,7	34,5 ± 12,1	0,005
	Loppupiste	50,3 ± 18,0	47,3 ± 16,9	44,0 ± 15,2	0,212
	Muutos	7,8 ± 15,9	12,9 ± 14,1	9,6 ± 11,2	0,213
20 til-%	Alkupiste	26,2 ± 12,3	17,3 ± 9,7	17,7 ± 10,1	0,0001
	Loppupiste	39,9 ± 17,1	36,9 ± 15,0	31,9 ± 14,1	0,053
	Muutos	13,6 ± 14,6	19,6 ± 16,4	14,2 ± 12,9	0,114
30 til-%	Alkupiste	16,6 ± 10,7	11,3 ± 8,8	11,6 ± 9,1	0,016
	Loppupiste	31,7 ± 17,0	30,5 ± 12,6	23,0 ± 11,7	0,008
	Muutos	15,2 ± 15,5	19,2 ± 13,3	11,7 ± 12,0	0,041
		Loppupisteen viabiliteetin kovariaattikorjattu keskiarvoestimaatti ± keskivirhe			p (ANCOVA)
10 til-%		46,3 ± 2,1	49,4 ± 2,1	46,1 ± 2,1	0,444
20 til-%		36,4 ± 2,2	38,8 ± 2,2	33,6 ± 2,2	0,227
30 til-%		29,9 ± 2,0(a,b)	31,5 ± 2,0(a)	24,0 ± 2,0(b)	0,021*

(a), (b) ja (c): Tulokset, joissa on eri kirjain, eroavat toisistaan merkitsevästi. Ryhmien väliset keskinäiset vertailut Bonferroni-korjauksella: \*50/50 vs KASVI: p=0,024

## 7. Pohdinta

### 7.1. Viabiliteettitulokset

Tutkimuksessa havaittiin, että kasviproteiinipainotteisimpaa ruokavaliota noudattaneiden tutkittavien ulostevesi vähentää HCA-7-paksusuolisyyöpäsolujen viabiliteettia enemmän kuin runsaammin eläinproteiinia noudattaneiden ulostevesi. Tämä tulos tosin näkyi tilastollisesti merkitsevästi vain vahvimmalle ulostevesipitoisuudelle altistettaessa. Ainakin ulosteveden genotoksisuudessa on aikaisemmassa tutkimuksessa havaittu suurta sekä yksilön sisäistä että yksilöiden välistä vaihtelua samanlaisesta ruokavaliosta huolimatta (85), joten on todennäköistä, että samanlaista vaihtelua olisi myös viabiliteetin suhteen. Tällöin voi olla mahdollista, että tutkimuksen koko ei vielä riittänyt osoittamaan tilastollisesti merkitsevää eroa ryhmien välillä muilla pitoisuuksilla. Voimalaskelmat tässä tutkimuksessa olivatkin tehty paastoverensokeriin ja ulosteen hemiperäisten typpiyhdisteiden pitoisuuden perustuen. Toisaalta myös satunnaistamisesta huolimatta havaittu harmillinen ero ryhmien alkupisteen viabiliteeteissa voinee vaikuttaa analyysiin.

Viabiliteetin pieneneminen eläinproteiinin lähteiden käytön vähentyessä ja kasviproteiinin lähteiden käytön kasvaessa sopii tutkimuksen taustaoletukseen, jonka mukaan suurempi viabiliteetti kertoisi suuremmasta suolistosyöpäriskistä. Tämä tarkoittaisi sitä, että suurempi eläinproteiinin, punaisen lihan tai lihajalosteiden määrä ELÄIN-ryhmän ja 50/50-ryhmän ruokavalioissa voisi myös johtaa suurempaan riskiin, mikä olisi linjassa aiempien havainnoivien tutkimusten kanssa (1).

Samoista tutkimuksen ulostenäytteistä on myös aiemmin analysoitu N-nitrosoyhdisteiden (NOC) pitoisuuksia (86). Tässä havaittiin, että ryhmien välillä on merkitsevä ero NOC:ien pitoisuuksissa – ELÄIN-ryhmällä pitoisuus oli suurin ja KASVI-ryhmällä pienin. Erot näiden karsinogeenisten yhdisteiden määrässä paksusuoleissa on eräs yksi uskottava mekanismi suolistosyöpäriskin suurenemiselle (69–71). Korrelaatiota viabiliteetin ja erilaisten NOC:ien välillä ei kuitenkaan havaittu (tuloksia ei esitetä tässä). NOC:it tosin yhdistetään ennemminkin mutaatioiden syntyyn, eivätkä ne välttämättä vaikuta syöpäsolujen viabiliteettiin, vaikka syöpäriskiä lisäävätkin. Joka tapauksessa NOC:it eivät tässä työssä selittäneet viabiliteettitulosta.

Suoranaista annosvasteen olemassaoloa eläinproteiinin määrän ja viabiliteetin välillä ei tuloksista ole nähtävissä; erot viabiliteetissa ELÄIN- ja 50/50-ryhmien välillä ovat hyvin marginaaliset, ja kahdessa alimmassa ulostevesipitoisuudessa suurin viabiliteetti näyttää olevan ennemminkin 50/50-ryhmällä. Erityisesti tähän saattavat vaikuttaa erot alkupisteen viabiliteeteissa häivyttäen annosvastetta.

BMI korreloi positiivisesti viabiliteetin kanssa erityisesti tutkimuksen lopussa. WCRF:n mukaan on vahvaa näyttöä siitä, että ylipaino ja lihavuus lisäävät suolistosyöpien riskiä (1), joten tämä havaittu korrelaatio osaltaan vahvistaa sitä tutkimuksen hypoteesia, että korkeampi viabiliteetti kertoisi suuremmasta riskistä. Yhteyttä välittävistä mekanismeista ei toistaiseksi ole tietoa, mutta eräs hypoteesi on, että suoliston mikrobisto vaikuttaisi ulosteveteen eri tavalla lihavilla ja normaali-painoisilla, koska suoliston mikrobiston koostumuksessa ja tämän takia myös mikrobiston toiminnassa on havaittu eroa näiden ryhmien välillä (87).

Tilastollisesti merkitsevää positiivista korrelaatiota havaittiin myös proteiinin-saannin ja viabiliteetin välillä. Suurempi proteiinimäärä ruokavaliossa johtanee siihen, että suurempi määrä proteiineista peräisin olevia tyyppiä sisältäviä yhdisteitä päätyy paksusuoleen ja ulosteveteen. Typpi-yhdisteet voivat toimia kasvutekijöinä soluille, mikä siis voisi lisätä syöpäsolujen viabiliteettia.

Kalsiumin saanti korreloi viabiliteetin kanssa vain alkupisteessä. Kalsiumia pidetään suolistosyöpäriskiä vähentävänä ravintoaineena (1,71,73,74), ja sen saanti oli suurinta ELÄIN-ryhmässä vähentyen kasviproteiinipainotteisemmilla ruokavalioilla (84). Voi olla, että erot kalsium saannissa ovat voineet vaikuttaa myös tässä tutkimuksessa kaventaen ryhmien välisiä eroja viabiliteetissa.

## 7.2. Ulosteveden pH

Ulosteveden pH oli matalin KASVI-ryhmällä ja korkein ELÄIN-ryhmällä. 50/50-ryhmä oli näiden välistä, joten jonkinlaista annosvastetta voisi olla tulkittavissa, vaikka tilastollisesti merkitsevä ero löytyi vain ääri-ryhmien väliltä. Eräs selitys pH-eroille voisi olla erot kuidun saannissa; kuidun saanti suureni kasviproteiinin osuuden kasvaessa ruokavalioissa (83). Tietyt suoliston mikrobit tuottavat lyhyt-ketjuisia rasvahappoja fermentoidessaan ravintokuitua, mikä alentaa pH:ta (23).



Korrelaatioita tarkastellessa löytyikin merkitsevä negatiivinen korrelaatio kuidun saannin ja pH:n väliltä (taulukko 3). Korrelaatio on tosin verraten pieni, mikä saattaa selittyä sillä, että vain pieni osa lyhytketjuisista rasvahapoista päätyy ulosteesseen, koska suolen epiteelisolut käyttävät niitä mieluusti energianlähteenään (23).

Myös pH ja viabiliteetti korreloivat keskenään positiivisesti. Lyhytketjuisista rasvahapoista voisi löytyä osaselitys myös tälle korrelaatiolle, koska erityisesti butyraatti säätelee mm. epiteelisolujen ohjautumista apoptoosiin (21). Aiemmin onkin havaittu käänteinen korrelaatio ulosteveden pH:n ja HT-29- paksusuolisyöpäsolujen apoptoosiin indusoinnin välillä *in vitro* -altistuksessa (28).

Kuidun saanti ei kuitenkaan korreloinut lainkaan viabiliteetin kanssa loppupisteessä, ja alkupisteessäkin korkeintaan hieman positiivisesti, mikä vähentää sen uskottavuutta pH:n ja viabiliteetin välisen korrelaation selittäjänä. Toisaalta kuidun saanti oli tutkittavilla jo alkupisteessä verraten suurta (28,7 g/vrk) ja reilusti yli suomalaisten keskiarvon (83). Saanti vielä nousi intervention aikana 50/50- ja KASVI-ryhmillä. Voi kuitenkin olla, että kuidun saannin suhteen on olemassa jonkinlainen kynnyssaanti, joka ylläpitää mikrobistoa. Kun kynnyssaanti ylitetään, niin erot kuidun saannissa eivät vaikuta enää kovin paljon.

### **7.3. Ulosteveden ja WST-8-reagenssin välisen interaktion vähentämisen vaikutus viabiliteettituloksiin**

Interaktion vähentämisen vaikutus tuloksiin oli verrattain pieni; tilastollisesti merkitsevä ero ryhmien välillä säilyi vahvimalla pitoisuudella altistettaessa, tosin *post hoc* -vertailussa merkitsevä ero jäi vain 50/50- ja KASVI-ryhmien välille (taulukko 4). Jonkin verran vähentäminen siis heikensi havaittua vaikutusta.

Interaktion vähentäminen tuloksista saattaa kuitenkin olla ongelmallista. Todellista yhteisvaikutusta tilanteessa, jossa on soluja mukana ei voi suoraan päätellä soluttomien kuoppien yhteisvaikutuksen perusteella, koska solut voivat vaikuttaa systeemiin ja muuttaa liuoksen kemiallista koostumusta niin, että interaktion suuruuskin muuttuu. Tätä osoittanee se, että muutaman näytteen kohdalla viabiliteettitulukemaksi tuli negatiivinen, kun viabiliteetti laskettiin interaktioabsorbanssin vähentämisen jälkeen. Tästä johtuen tuloksia, jotka oli laskettu ilman interaktioab-

sorbanssin vähentämistä, pidettiin luotettavampina, joten ne päätettiin raportoida tutkimuksen päätuloksina.

Interaktion tutkimisesta ja siitä saaduista tuloksista on tarkemmin selostettu liitteessä 4.

## **7.4. Tutkimuksen vahvuudet ja heikkoudet**

### **7.4.1. Vahvuudet**

Tutkimuksen interventio-osan vahvuuksia oli pitkä kesto. Ruokavalioiden noudattaminen 12 viikon ajan pitäisi olla riittävä aika, että eroja ryhmien välillä näkyisi, sillä suoliston aineenvaihdunnan ja mikrobiprofiilin on todettu muuttuvan jo neljän viikon ravintointervention seurauksena (88). Toinen vahvuus oli tutkittavien suuri määrä ja tutkimuksesta pois pudonneiden pieni määrä (kuva 4). Myös proteiinin lähteiden jakaminen tutkittaville oletettavasti lisäsi ruokavalioiden noudattamisen onnistumista. Ruokapäiväkirja-aineiston perusteella tutkittavat saivat 80 % energiastaan heille jaetuista elintarvikkeista (83). Lisäksi jaettavien elintarvikkeiden ravintosisältö oli tarkkaan tiedossa, jolloin ruokapäiväkirjojen tallentaminen oli helpompaa ja loppupisteen ruoankäyttöaineisto sitä kautta tarkempaa.

Tutkimuksen vahvuutena voi pitää myös asetelmaa, joka yhdisti proteiininlähteet kokonaisruokavalioaltisteeseen sekä tutkittavilta eristetyn ulosteveden käytön solukokeissa, ja oli tietävästi ensimmäinen laatuaan. Ruokavalio on altisteena laajempi ja vahvempi kuin yksittäiset ravintoaineet tai elintarvikkeet. Ulosteveden käyttö solukokeissa tarjoaa kokonaisvaltaisemman riskiarvion kuin esimerkiksi yksittäisten suolistometaboliittien määrittäminen. Erityisesti käytettäessä viabiliteettia vasteena voidaan saada tietoa myös ulosteveden ja sitä kautta ruokavalion mahdollisista positiivisista ja syöpäsolujen kasvua rajoittavista vaikutuksista.

Ulostevesiälymittauksissa kolmen rinnakkaisen näytteen ja kolmen eri ulostevesiälymittauksen käyttö lisää tulosten luotettavuutta. Solukokeiden suorittaminen myös onnistui hyvin ja rinnakkaisnäytteiden tuloksissa oli vain vähäistä vaihtelua; ainoastaan muutaman näytteen rinnakkaiset absorbanssitulokset poikkesivat toisistaan niin paljon, että koe uusittiin, mikä kertoo koesysteemin vakauudesta. Lisäk-

si kaikki tämän solulinjan kokeet suoritti sama henkilö, jolloin eri henkilöiden erilaisesta pipetointikäsiälästä johtuvaa vaihtelua ei ollut.

Tutkimuksen vahvuutena voi myös pitää sitä, että WST-8-reagenssin ja ulosteveden välinen interaktio mitattiin; kirjallisuudessa ei tullut vastaan yhtään tutkimusta, jossa interaktiota olisi otettu huomioon.

#### **7.4.2. Heikkoudet ja harhan lähteet**

##### *Interventio*

Tutkittavat olivat jonkin verran valikoituneita; enemmistö oli naisia (N = 105) ja korkeasti koulutettuja, ja todennäköisesti keskimääräistä terveystietoisempia; terveystietoisuuteen viittaa heidän keskimääräistä suomalaista suurempi kuidun saantinsa sekä pienempi painoindeksi (24,8 kg/m<sup>2</sup>; keskimäärin suomalaisilla miehillä 27,7 kg/m<sup>2</sup> ja naisilla 27,5 kg/m<sup>2</sup>) (83). Tämä voi tarkoittaa sitä, että heidän kroonisten sairauksien riskinsä on tavanomaista pienempi, mikä voi näkyä myös riskimarkkereissa. Ruokapäiväkirjan käyttöön ruoankäytön mittarina liittyy myös sille tyypilliset virhelähteet, kuten mm. kirjaamisen vaikutus syömiseen sekä melko tyypillinen aliraportointi (67,89).

Proteiinin keskimääräisessä kokonaissaannissa oli eroja ryhmien välillä, ja KASVI-ryhmä jäi 17 E% tavoitteesta. Syytä tälle on pohdittu aiemmassa pro gradu -työssä (67). Korrelaatio viabiliteetin ja proteiinin saannin välillä oli havaittavissa, mutta korrelaatio on sen verran heikko, että se tuskin täysin selittää eroa viabiliteeteissa KASVI- ja ELÄIN-ryhmien sekä KASVI- ja 50/50-ryhmien välillä.

Tämän tutkimuksen asetelma, jossa jako tehdään kasvi- ja eläinproteiinien välille, ei välttämättä ole kaikkein mielekkäin suolistosyöpäriskimarkkerien tutkimiseen. Kaikki eläinproteiinilähteet eivät ole suolistosyöpäriskin kannalta välttämättä haitallisia, vaan maitotuotteet, kala ja siipikarja voisivat olla jopa suojaavia (1,60,61,71). Erot esimerkiksi viabiliteetissa saattavat tällöin jäädä pienemmiksi eikä tilastollista merkitsevyyttä saavuteta niin helposti kuin vaikkapa tilanteessa, jossa korvataan punaista lihaa ja lihajalosteita kasviproteiininlähteillä. ScenoProthankkeessa oli suolistobiomarkkereiden lisäksi olennaista myös muut terveysmarkkerit sekä ruokaturva- ja ympäristönäkökulmat, joten nämä vaikuttivat tutkimusasetelmaan.

### *Ulosteveden valmistus*

Ulostenäytteiden homogenoinnilla ulosteveden valmistuksessa saattoi olla vaikutusta ulosteveden koostumukseen: Homogenoinnissa pilkkoontuvat myös sulamattomana suoliston läpi kulkeneet ruoka-aineet, kuten kokonaisena tai vain osittain pureskeltuna niellyt siemenet ja marjat. Tällöin niistä saattoi uuttua yhdisteitä, joita ei tosiasiaassa ole ulosteessa liukoisessa muodossa. Koska kasviproteiinipainotteiseen ruokavalioon kuului enemmän siemeniä ja pähkinöitä, myös näistä mahdollisesti uuttuneiden yhdisteiden osuus tätä ruokavaliota noudattaneiden ulostevedessä oli todennäköisesti suurempi. Tämän seikan vaikutuksen suuntaa ja suuruutta on mahdoton arvioida. Myös osa suolen mikrobeista mahdollisesti hajosi homogenoinnissa, joten mikrobien sisällöstäkin saattoi tulla ulosteveteen yhdisteitä ja entsyymejä, joita siellä ei normaalisti esiintyisi.

### *Solukokeet ulostevesinäytteillä*

Viabiliteettikokeet arvioivat ulostevettä kokonaisuutena, mutta samalla menetetään mahdollisuus saada tietoa mahdollisten vaikutusten mekanismeista. Tämän takia pelkkien viabiliteettien perusteella tehtävissä tulosten tulkinnoissa on oltava varovainen.

Olosuhteet solumaljalla ovat hyvin erilaiset kuin suolen epiteelillä. Fysiologista eli suolen lumenin olosuhteita vastaavaa ulostevesipitoisuutta altistuskokeita tehdessä ei tiedetä, ja lisäksi suolen epiteelisolukkoa suojaava limakerros, mitä solumaljalla ei ole (90). Ei siis voi myöskään tietää vastaako se ulostevesipitoisuus, jossa eroja tässä tutkimuksessa löydettiin, fysiologista pitoisuutta? Lisäksi soluviljelmistä puuttuu ympäriltä koko muu elimistö, verenkierto ja immuunijärjestelmä, jolloin mm. endokriininen signaalointi puuttuu ja hapenkuljetuksen puuttuessa solujen energiametabolia on pääasiassa glykolyyttistä (91).

Eräässä aiemmassa tutkimuksessa on tarkasteltu WST-reagenssia pelkistävän mitokondrion sukkinaattireduktaasientsyymin toiminnan tehokkuuden riippuvuutta pH:sta (92). Huomattiin, että entsyymi tuottaa formazania tehokkaammin korkeammassa pH:ssa. Tämä voisi tarkoittaa sitä, että havaitut pH-erot tässä tutkimuksessa voisivat korostaa ryhmien välisiä eroja viabiliteettituloksissa; KASVI-ryhmän ulosteveden pH oli alhaisin, jolloin tässä ulostevedessä kasvaneiden solujen väriainetta tuottava entsyymi olisi tuottanut vähemmän väriä ja siten myös pienem-

män viabiliteettituloksen. Edellä mainitussa tutkimuksessa testattu pH-alue (7,2 – 8,4) oli kuitenkin korkeampi ja laajempi mitä tämän tutkimuksen ulostevesinäytteissä, joten yleistystä ei voi suoraan tehdä. Lisäksi ulostevedet oli laimennettu kasvatusliuokseen, joka saattoi puskuroida ja vähentää pH-eroja.

#### *Viabiliteetin suureneminen*

Viabiliteettilukemat olivat merkittävästi ja erittäin merkitsevästi korkeammat loppupisteessä verrattuna alkupisteeseen. Jos viabiliteetin alentumisen ajatellaan kertyvän alentuneesta syöpäriskistä, olisi outoa, jos interventio olisi vaikuttanut riskiä lisäävästi. Eräs eroa selittävä tekijä saattaa olla se, että alku- ja loppupisteiden ko-keissa käytetyt solut olivat eri pakastuserästä, jolloin solujen genomissa saattoi olla eroja syöpäsolujen mutaatioalttiuden vuoksi. Tätä ei valitettavasti huomattu ottaa huomioon soluampulleja valittaessa. Ero vielä korostuu, jos viabiliteetit lasketaan vähentämällä interaktioabsorbanssit, koska interaktio oli alkupisteiden ko-keissa korkeampi kuin loppupisteessä (kuva L1, liitteessä 4).

### **7.5. Tulosten merkittävyys ja tulevaisuuden tutkimustarpeet**

Ruokavalion vaikutuksesta suolistosyöpäriskiin ei yhdellä solulinjalla tehtyjen viabiliteettimittausten perusteella voi tehdä kovin pitkälle meneviä johtopäätöksiä. Periaatteessa ei voi edes sanoa, onko viabiliteetin väheneminen kasviproteiinipainotteisimmalla ruokavaliolla hyvä vai huono merkki, vaikka toki luvussa 2.5. on yritetty argumentoida, että näin on turvallista olettaa. Solut ovat siis voineet kuolla myös nekroottisesti ulosteveden suuren sytotoksisuuden takia, minkä vuoksi olisi hyvä tutkia erikseen myös ulostevesinäytteiden kykyä indusoida apoptoosia. Tosin lienee hyvin epätodennäköistä, että tutkittavien ulostevesi olisi kovin myrkyllistä, koska näytteet tulivat kuitenkin terveiltä ja normaalia ruokavaliota syövilä henkilöiltä. Lisäksi se, että juuri KASVI-ryhmän tapauksessa viabiliteetti aleni, sopii yhteen aiemman tutkimusnäytön kanssa. Altistuskokeiden lopussa otettuja mikroskooppikuvia tarkastelemalla voisi ehkä päätellä suuntaa antavasti jotain solujen kuoleamisen mekanismeista (93), joten tämä voisi olla yksi lisätutkimuksen aihe.

Viabiliteettikokeet tulisi kuitenkin tehdä myös jollain normaalin kaltaisella kontrollisolulinjalla. Tukeakseen tämän tutkimuksen tuloksia, tulisi kontrollisolujen

viabiliteetin alentua vähemmän tai jopa kasvaa kasviproteiiniolosuhteiden kasvattamisen myötä. Tällainen tulos osoittaisi, että kasviproteiinilähteistä tulee pak-susuoleen enemmän hyödyllisiä ja syöpäsolujen kasvua rajoittavia yhdisteitä sekä vähemmän haitallisia yhdisteitä kuin eläinproteiinilähteistä. Kokeet olisi hyvä toistaa myös muilla syöpäsolulinjoilla. Lisäksi genotoksisuuden mittaukset antaisivat lisää tietoa ulosteveden ominaisuuksista ja ruokavalion vaikutuksista syöpäriskiin. Suolistosyöpäriskin ja siitä kertovien biomarkkereiden tutkimisen kannalta tämän tutkimuksen asetelmaa hedelmällisempi voisi olla asetelma, jossa kasviproteiinilähteillä korvattaisiin nimenomaan punaista lihaa ja lihajalosteita, koska eläinproteiinin lähteistä lähinnä nämä näyttäytyvät riskiä lisäävinä (1).

Tämän työn tuloksia täytyy siis tarkastella osana ScenoProt-tutkimuksen muita/myöhempiä tuloksia sekä osana muistakin tutkimuksista koostuvaa kokonaisvidenssiä. Ruokavalioiden ja proteiininlähteiden edullisuuden kokonaisarvioinnissa täytyy toki ottaa huomioon myös vaikutukset muiden sairauksien riskiin sekä ruokavalion ravitsemukselliseen laatuun ja riittävyyteen kokonaisuutena.

## 8. Johtopäätökset

Tutkimuksen perusteella KASVI-ryhmän ulostevesi vähensi HCA-7-paksusuolisyöpäsolujen viabiliteettia *in vitro* verrattuna 50/50- ja ELÄIN-ryhmien ulosteveteen. Tämä voi viitata siihen, että kasviproteiinilähteiden lisääminen ja eläinproteiinilähteiden vähentäminen alentaa suolistosyövän riskiä. Tarkempien johtopäätösten tekemiseksi tulisi altistuskoe toistaa useammalla paksusuolisyöpäsolulinjalla sekä jollakin normaalin kaltaisella kontrollisolulinjalla.

## Lähteet

1. World Cancer Research Fund / American Institute for Cancer Research. Continuous update project report: Diet, nutrition, physical activity and colorectal cancer [Internet]. 2017 [viitattu 2019 huhti 25]; Saatavilla: [wcrf.org/Colorectal-Cancer-2017](http://wcrf.org/Colorectal-Cancer-2017)
2. Parkin DM, Boyd L, Walker LC. The fraction of cancer attributable to lifestyle and environmental factors in the UK in 2010. *Br J Cancer*. 2011;105 Suppl 2:S77-81.
3. Pearson JR, Gill CIR, Rowland IR. Diet, fecal water, and colon cancer--development of a biomarker. *Nutr Rev*. 2009;67:509-26.
4. Ahnen RT, Jonnalagadda SS, Slavin JL. Role of plant protein in nutrition, wellness, and health. *Nutr Rev*. 2019.
5. Heikkilä J, Rokka S, Tapiola T, toimittajat. ScenoProt - Uusia proteiininlähteitä ruokaturvan ja ympäristön hyväksi [Internet]. Luonnonvarakeskus; 2018 [viitattu 2019 huhti 25]; Saatavilla: [www.luke.fi/scenoprot/wp-content/uploads/sites/5/2018/06/Uusia-proteiinilahteita-ruokaturvan-ja-ympariston-hyvaksi-2-painos-web.pdf](http://www.luke.fi/scenoprot/wp-content/uploads/sites/5/2018/06/Uusia-proteiinilahteita-ruokaturvan-ja-ympariston-hyvaksi-2-painos-web.pdf)
6. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 2011;144:646-74.
7. Rafter J, Govers M, Martel P, Pannemans D, Pool-Zobel B, Rechkemmer G, ym. PASSCLAIM – diet-related cancer. *Eur J Nutr*. 2004;43 Suppl 2:II47-84.
8. Shivappa N, Godos J, Hébert JR, Wirth MD, Piuri G, Speciani AF, ym. Dietary inflammatory index and colorectal cancer Risk – A meta-analysis. *Nutrients*. 2017;9.
9. Gill CIR, Rowland IR. Diet and cancer: assessing the risk. *Br J Nutr*. 2002;88 Suppl 1:S73-87.
10. Evans K. Sentinel cells keep watch over your gut | Microbiology [Internet]. LabRoots. 2016 [viitattu 2020 tammi 21]; Saatavilla: <https://www.labroots.com/trending/microbiology/3564/sentinel-cells-watch-gut>
11. Roy S, Majumdar A. Signaling in colon cancer stem cells. *J Mol Signal*. 2012;7:Art. 11.
12. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007;35:495-516.
13. Derry MM, Raina K, Agarwal C, Agarwal R. Identifying molecular targets of lifestyle modifications in colon cancer prevention. *Front Oncol*. 2013;3:119.



14. Leslie A, Carey FA, Pratt NR, Steele RJC. The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *BJS*. 2002;89:845–60.
15. Klinder A, Karlsson PC, Clune Y, Hughes R, Glei M, Rafter JJ, ym. Fecal water as a non-invasive biomarker in nutritional intervention: comparison of preparation methods and refinement of different endpoints. *Nutr Cancer*. 2007;57:158–67.
16. Järvinen HJ, Kouri M, Örserlund P. Paksusuolen ja peräsuolen syövän esiasteet [Internet]. Duodecim Oppiportti. 2013 [viitattu 2019 kesä 7]; Saatavilla: <http://www.oppoportti.fi/op/syt00407>
17. Thrumurthy SG, Thrumurthy SSD, Gilbert CE, Ross P, Haji A. Colorectal adenocarcinoma: risks, prevention and diagnosis. *BMJ*. 2016;354:i3590.
18. Buyse M, Molenberghs G. Criteria for the Validation of Surrogate Endpoints in Randomized Experiments. *Biometrics*. 1998;54:1014–29.
19. Martínez ME, Marshall JR, Giovannucci E. Diet and cancer prevention: the roles of observation and experimentation. *Nat Rev Cancer*. 2008;8:694–703.
20. Cappell MS. Pathophysiology, clinical presentation, and management of colon cancer. *Gastroenterol Clin North Am*. 2008;37:1–24, v.
21. Brahe LK, Astrup A, Larsen LH. Is butyrate the link between diet, intestinal microbiota and obesity-related metabolic diseases? *Obes Rev*. 2013;14:950–9.
22. O’Keefe SJD, Ou J, Aufreiter S, O’Connor D, Sharma S, Sepulveda J, ym. Products of the colonic microbiota mediate the effects of diet on colon cancer risk. *J Nutr*. 2009;139:2044–8.
23. Verbeke KA, Boobis AR, Chiodini A, Edwards CA, Franck A, Kleerebezem M, ym. Towards microbial fermentation metabolites as markers for health benefits of prebiotics. *Nutr Res Rev*. 2015;28:42–66.
24. Klinder A, Förster A, Caderni G, Femia AP, Pool-Zobel BL. Fecal water genotoxicity is predictive of tumor-preventive activities by inulin-like oligofructoses, probiotics (*Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis*), and their synbiotic combination. *Nutr Cancer*. 2004;49:144–55.
25. Møller G, Andersen JR, Jalo E, Ritz C, Brand-Miller J, Larsen TM, ym. The association of dietary animal and plant protein with putative risk markers of colorectal cancer in overweight pre-diabetic individuals during a weight-reducing programme: a PREVIEW sub-study. *Eur J Nutr*. 2019.
26. Yao CK, Muir JG, Gibson PR. Review article: insights into colonic protein fermentation, its modulation and potential health implications. *Aliment Pharmacol Ther*. 2016;43:181–96.

27. Rafter J, Geltner U, Bruce R. Cellular toxicity of human faecal water--possible role in aetiology of colon cancer. *Scand J Gastroenterol Suppl.* 1987;129:245–50.
28. Haza AI, Glinghammar B, Grandien A, Rafter J. Effect of colonic luminal components on induction of apoptosis in human colonic cell lines. *Nutr Cancer.* 2000;36:79–89.
29. Ediriweera MK, Tennekoon KH, Samarakoon SR. In vitro assays and techniques utilized in anticancer drug discovery. *J Appl Toxicol JAT.* 2019;39:38–71.
30. Gordon JL, Brown MA, Reynolds MM. Cell-based methods for determination of efficacy for candidate therapeutics in the clinical management of cancer. *Dis Basel Switz.* 2018;6.
31. Bonnesen C, Eggleston IM, Hayes JD. Dietary indoles and isothiocyanates that are generated from cruciferous vegetables can both stimulate apoptosis and confer protection against DNA damage in human colon cell lines. *Cancer Res.* 2001;61:6120–30.
32. Megna BW, Carney PR, Nukaya M, Geiger P, Kennedy GD. Indole-3-carbinol induces tumor cell death: Function follows form. *J Surg Res.* 2016;204:47–54.
33. Briviba K, Schnäbele K, Schwertle E, Blockhaus M, Rechkemmer G. Beta-carotene inhibits growth of human colon carcinoma cells in vitro by induction of apoptosis. *Biol Chem.* 2001;382:1663–8.
34. Choi DW, Lim MS, Lee JW, Chun W, Lee SH, Nam YH, ym. The cytotoxicity of kahweol in HT-29 human colorectal cancer cells is mediated by apoptosis and suppression of heat shock protein 70 expression. *Biomol Ther.* 2015;23:128–33.
35. Murad LD, Soares N da CP, Brand C, Monteiro MC, Teodoro AJ. Effects of caffeic and 5-caffeoylquinic acids on cell viability and cellular uptake in human colon adenocarcinoma cells. *Nutr Cancer.* 2015;67:532–42.
36. Hou N, Liu N, Han J, Yan Y, Li J. Chlorogenic acid induces reactive oxygen species generation and inhibits the viability of human colon cancer cells. *Anti-cancer Drugs.* 2017;28:59–65.
37. Eberhardt MV, Lee CY, Liu RH. Antioxidant activity of fresh apples. *Nature.* 2000;405:903.
38. Wang Q, Chen Q, He M, Mir P, Su J, Yang Q. Inhibitory effect of antioxidant extracts from various potatoes on the proliferation of human colon and liver cancer cells. *Nutr Cancer.* 2011;63:1044–52.
39. Zhao C, Giusti MM, Malik M, Moyer MP, Magnuson BA. Effects of commercial anthocyanin-rich extracts on colonic cancer and nontumorigenic colonic cell growth. *J Agric Food Chem.* 2004;52:6122–8.

40. Correa-Betanzo J, Allen-Vercoe E, McDonald J, Schroeter K, Corredig M, Paliyath G. Stability and biological activity of wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) polyphenols during simulated in vitro gastrointestinal digestion. *Food Chem.* 2014;165:522–31.
41. Pedersen G, Brynskov J, Saermark T. Phenol toxicity and conjugation in human colonic epithelial cells. *Scand. J. Gastroenterol.* 2002;37:74–9.
42. ATCC. CCD 841 CoN ATCC® CRL-1790™ *Homo sapiens* colon normal [Internet]. [viitattu 2020 helmi 4]; saatavilla: <https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-1790.aspx#documentation>
43. Moyer MP, Manzano LA, Merriman RL, Stauffer JS, Tanzer LR. NCM460, a normal human colon mucosal epithelial cell line. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 1996;32:315–7.
44. Liu LQ, Nie SP, Shen MY, Hu JL, Yu Q, Gong D, ym. Tea polysaccharides inhibit colitis-associated colorectal cancer via interleukin-6/STAT3 pathway. *J Agric Food Chem.* 2018;66:4384–93.
45. Pierre F, Santarelli RL, Chartron M, Allam O, Taché S, Naud N, ym. Freeze-dried ham promotes azoxymethane-induced mucin-depleted foci and aberrant crypt foci in rat colon. *Nutr Cancer.* 2010;62:567–73.
46. Pierre F, Santarelli R, Taché S, Guéraud F, Corpet DE. Beef meat promotion of dimethylhydrazine-induced colorectal carcinogenesis biomarkers is suppressed by dietary calcium. *Br J Nutr.* 2008;99:1000–6.
47. Windey K, De Preter V, Huys G, Broekaert WF, Delcour JA, Louat T, ym. Wheat bran extract alters colonic fermentation and microbial composition, but does not affect faecal water toxicity: A randomised controlled trial in healthy subjects. *Br J Nutr.* 2015;113:225–38.
48. Schnäbele K, Briviba K, Bub A, Roser S, Pool-Zobel BL, Rechkemmer G. Effects of carrot and tomato juice consumption on faecal markers relevant to colon carcinogenesis in humans. *Br J Nutr.* 2008;99:606–13.
49. Ingman T. Kotimaisten marjojen lisäys sekaruokavalioon muuttaa ulosteveden ominaisuuksia – Marjojen vaikutus ulosteveden polyfenolimetaboliitteihin ja ulostevedelle altistettujen paksusuolisyöpäsolujen viabiliteettiin [Internet] [Pro Gradu]. [Helsinki]: Helsingin yliopisto; 2018 [viitattu 2019 helmi 19]. Saatavilla: <http://urn.fi/URN:NBN:fi:hulib-201806122475>
50. Liao LM, Loftfield E, Etemadi A, Graubard BI, Sinha R. Substitution of dietary protein sources in relation to colorectal cancer risk in the NIH-AARP cohort study. *Cancer Causes Control CCC.* 2019;30:1127–35.
51. Song M, Fung TT, Hu FB, Willett WC, Longo VD, Chan AT, ym. Association of animal and plant protein intake with all-cause and cause-specific mortality. *JAMA Intern Med.* 2016;176:1453–63.

52. Budhathoki S, Sawada N, Iwasaki M, Yamaji T, Goto A, Kotemori A, ym. Association of animal and plant protein intake with all-cause and cause-specific mortality. *JAMA Intern Med.* 2019.
53. Song M, Wu K, Meyerhardt JA, Yilmaz O, Wang M, Ogino S, ym. Low-carbohydrate diet score and macronutrient intake in relation to survival after colorectal cancer diagnosis. *JNCI Cancer Spectr.* 2018;2:pk077.
54. Gilsing AMJ, Schouten LJ, Goldbohm RA, Dagnelie PC, van den Brandt PA, Weijenberg MP. Vegetarianism, low meat consumption and the risk of colorectal cancer in a population based cohort study. *Sci Rep.* 2015;5:13484.
55. Godos J, Bella F, Sciacca S, Galvano F, Grosso G. Vegetarianism and breast, colorectal and prostate cancer risk: an overview and meta-analysis of cohort studies. *J Hum Nutr Diet.* 2017;30:349–59.
56. Alexander DD, Weed DL, Cushing CA, Lowe KA. Meta-analysis of prospective studies of red meat consumption and colorectal cancer. *Eur J Cancer Prev Off J Eur Cancer Prev Organ ECP.* 2011;20:293–307.
57. Chan DSM, Lau R, Aune D, Vieira R, Greenwood DC, Kampman E, ym. Red and processed meat and colorectal cancer incidence: Meta-analysis of prospective studies. *PLoS ONE [Internet].* 2011 [viitattu 2019 loka 23];6. Saataavilla: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3108955/>
58. Larsson SC, Wolk A. Meat consumption and risk of colorectal cancer: a meta-analysis of prospective studies. *Int J Cancer.* 2006;119:2657–64.
59. Aune D, Chan DSM, Vieira AR, Navarro Rosenblatt DA, Vieira R, Greenwood DC, ym. Red and processed meat intake and risk of colorectal adenomas: a systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. *Cancer Causes Control CCC.* 2013;24:611–27.
60. Shi Y, Yu P-W, Zeng D-Z. Dose-response meta-analysis of poultry intake and colorectal cancer incidence and mortality. *Eur J Nutr.* 2015;54:243–50.
61. Wu S, Feng B, Li K, Zhu X, Liang S, Liu X, ym. Fish consumption and colorectal cancer risk in humans: a systematic review and meta-analysis. *Am J Med.* 2012;125:551-559.e5.
62. Johnston BC, Zeraatkar D, Han MA, Vernooij RWM, Valli C, El Dib R, ym. Unprocessed Red Meat and Processed Meat Consumption: Dietary Guideline Recommendations From the Nutritional Recommendations (NutriRECS) Consortium. *Ann Intern Med.* 2019.
63. Rubin R. Backlash over meat dietary recommendations raises questions about corporate ties to nutrition scientists. *JAMA.* 2020.
64. Qian F, Riddle MC, Wylie-Rosett J, Hu FB. Red and processed meats and health risks: How strong is the evidence? *Diabetes Care.* 2020;43:265–71.

65. Li Y, Zhang T, Chen GY. Flavonoids and colorectal cancer prevention. Antioxidants [Internet]. 2018 [viitattu 2019 loka 16];7. Saatavilla: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6316869/>
66. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*. 2004;79:727–47.
67. Kuusisto H. Eläinproteiinin korvaaminen kasviproteiinilla ja sen vaikutus energiaravintoaineiden saantiin [Internet] [Pro Gradu]. Helsingin yliopisto; 2019. Saatavilla: <http://urn.fi/URN:NBN:fi:hulib-201906122717>
68. Gilani GS, Wu Xiao C, Cockell KA. Impact of antinutritional factors in food proteins on the digestibility of protein and the bioavailability of amino acids and on protein quality. *Br J Nutr*. 2012;108 Suppl 2:S315-332.
69. Bouvard V, Loomis D, Guyton KZ, Grosse Y, Ghissassi FE, Benbrahim-Tallaa L, ym. Carcinogenicity of consumption of red and processed meat. *Lancet Oncol*. 2015;16:1599–600.
70. Pajari A-M. Ravinto ja syöpä - tämä ainakin tiedetään. *Suom. Lääkärilehti*. 2012;67:3469–75.
71. Song M, Garrett WS, Chan AT. Nutrients, foods, and colorectal cancer prevention. *Gastroenterology*. 2015;148:1244-1260.e16.
72. Santarelli RL, Pierre F, Corpet DE. Processed meat and colorectal cancer: a review of epidemiologic and experimental evidence. *Nutr Cancer*. 2008;60:131–44.
73. Govers MJ, Termont DS, Lapré JA, Kleibeuker JH, Vonk RJ, Van der Meer R. Calcium in milk products precipitates intestinal fatty acids and secondary bile acids and thus inhibits colonic cytotoxicity in humans. *Cancer Res*. 1996;56:3270–5.
74. Bastide NM, Pierre FHF, Corpet DE. Heme iron from meat and risk of colorectal cancer: A meta-analysis and a review of the mechanisms involved. *Cancer Prev Res (Phila Pa)*. 2011;4:177–84.
75. Valdés L, Cuervo A, Salazar N, Ruas-Madiedo P, Gueimonde M, González S. The relationship between phenolic compounds from diet and microbiota: Impact on human health. *Food Funct*. 2015;6:2424–39.
76. Lampert IA, Kirkland S, Farrell S, Borysiewicz LK. HLA-DR expression in a human colonic carcinoma cell line. *J Pathol*. 1985;146:337–44.
77. Kirkland SC. Dome formation by a human colonic adenocarcinoma cell line (HCA-7). *Cancer Res*. 1985;45:3790–5.
78. Kirkland SC, Bailey IG. Establishment and characterisation of six human colorectal adenocarcinoma cell lines. *Br J Cancer*. 1986;53:779–85.

79. Ishiyama M, Miyazono Y, Sasamoto K, Ohkura Y, Ueno K. A highly water-soluble disulfonated tetrazolium salt as a chromogenic indicator for NADH as well as cell viability. *Talanta*. 1997;44:1299–305.
80. Sigma-Aldrich. Cell Counting Kit 8; product information.
81. Tominaga H, Ishiyama M, Ohseto F, Sasamoto K, Hamamoto T, Suzuki K, ym. A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay. *Anal Commun*. 1999;36:47–50.
82. Dojindo Laboratories. Cell Counting Kit-8 [Internet]. Dojindo Eur. [viitattu 2019 helmi 19]; Saatavilla: <https://www.dojindo.eu.com/store/p/456-Cell-Counting-Kit-8.aspx>
83. Päivärinta E, Itkonen ST, Pellinen T, Lehtovirta M, Erkkola M, Pajari A-M. Replacing animal-based proteins with plant-based proteins changes the composition of a whole Nordic diet—A randomised clinical trial in healthy finnish adults. *Nutrients*. 2020;12:943.
84. Viitakangas H. Kasvi- ja eläinproteiinipainotteisen ruokavalion vaikutus fosforin saantiin ja fosfaattaineenvaihduntaan — 12 viikon interventiotutkimus terveillä aikuisilla [Internet] [Pro Gradu]. Helsingin yliopisto; 2019. Saatavilla: <http://urn.fi/URN:NBN:fi:hulib-201906122632>
85. Osswald K, Becker TW, Grimm M, Jahreis G, Pool-Zobel BL. Inter- and intra-individual variation of faecal water - genotoxicity in human colon cells. *Mutat Res*. 2000;472:59–70.
86. Manngård J. Ersättning av djurproteiner med plantproteiner i kosten och dess inverkan på halten av N-nitroso föreningar i avföringen hos friska människor [Pro Gradu]. [Helsinki]: Helsingin yliopisto; 2019.
87. Bardou M, Barkun AN, Martel M. Obesity and colorectal cancer. *Gut*. 2013;62:933–47.
88. Cotillard A, Kennedy SP, Kong LC, Prifti E, Pons N, Le Chatelier E, ym. Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. *Nature*. 2013;500:585–8.
89. Männistö S. Ruoankäytön tutkimusmenetelmät. Teoksessa: Aro A, Mutanen M, Uusitupa M. Ravitsemustiede. 4. uudistettu painos. Helsinki: Duodecim; 2012.
90. Nordling MM, Glinghammar B, Karlsson PC, de Kok TMCM, Rafter JJ. Effects on cell proliferation, activator protein-1 and genotoxicity by fecal water from patients with colorectal adenomas. *Scand J Gastroenterol*. 2003;38:549–55.
91. Freshney RI. Biology of Cultured Cells. Teoksessa: Freshney, RI. Culture of animal cells: A manual of basic technique and specialized applications. John Wiley & Sons, Inc.; 2016.

92. Galow A-M, Gimsa J. WST-assay data reveal a pH dependence of the mitochondrial succinate reductase in osteoblast-like cells. *Data Brief*. 2017;12:442–6.
93. Rello S, Stockert JC, Moreno V, Gámez A, Pacheco M, Juarranz A, ym. Morphological criteria to distinguish cell death induced by apoptotic and necrotic treatments. *Apoptosis Int J Program Cell Death*. 2005;10:201–8.
94. Gratton J, Phetcharaburanin J, Mullish BH, Williams HRT, Thursz M, Nicholson JK, ym. Optimized sample handling strategy for metabolic profiling of human feces. *Anal Chem*. 2016;88:4661–8.
95. O’Sullivan V, Madrid-Gambin F, Alegra T, Gibbons H, Brennan L. Impact of sample storage on the NMR fecal water metabolome. *ACS Omega*. 2018;3:16585–90.
96. Saric J, Wang Y, Li J, Coen M, Utzinger J, Marchesi JR, ym. Species variation in the fecal metabolome gives insight into differential gastrointestinal function. *J Proteome Res*. 2008;7:352–60.
97. Yen S, Bolte E, Aucoin M, Allen-Vercoe E. Metabonomic evaluation of fecal water preparation methods: The effects of ultracentrifugation [Internet]. 2018 [viitattu 2020 maalis 4]; Saatavilla: <https://www.ingentaconnect.com/content/ben/cmb/2018/00000006/00000001/art00011>
98. Deda O, Gika HG, Wilson ID, Theodoridis GA. An overview of fecal sample preparation for global metabolic profiling. *J Pharm Biomed Anal*. 2015;113:137–50.
99. Karu N, Deng L, Slae M, Guo AC, Sajed T, Huynh H, ym. A review on human fecal metabolomics: Methods, applications and the human fecal metabolome database. *Anal Chim Acta*. 2018;1030:1–24.
100. Tedjo DI, Jonkers DMAE, Savelkoul PH, Masclee AA, van Best N, Pierik MJ, ym. The effect of sampling and storage on the fecal microbiota composition in healthy and diseased subjects. *PloS One*. 2015;10:e0126685.
101. Lauber CL, Zhou N, Gordon JI, Knight R, Fierer N. Effect of storage conditions on the assessment of bacterial community structure in soil and human-associated samples. *FEMS Microbiol Lett*. 2010;307:80–6.
102. Cardona S, Eck A, Cassellas M, Gallart M, Alastrue C, Dore J, ym. Storage conditions of intestinal microbiota matter in metagenomic analysis. *BMC Microbiol*. 2012;12:158.

## Liitteet

### Liite 1. Ohjeet ulostenäytteen ottoa varten (aloituskäynti)

*Hyvä tutkimushenkilö,*

Olet saanut näytteenottovälineet ulostenäytteiden keräämiseksi. Kerää näytteet **kolmelta päivältä ennen ruokavaliojakson alkua, eli ennen kuin aloitat tutkimuksessa jaettavien tuotteiden syömisen.**

**Styroxlaukku sisältää seuraavat näytteenottoon tarvittavat välineet:**

- 2 kylmävaraajaa
- Kaarimaljoja
- Iso vihreä muovipussi
- Vaaka
- 1 minigrip pussi, jossa on
  - o kaksi (2) kannellista muovipurkkia
  - o 1 näyteputki, jossa näytteenottoa varten sisäänrakennettu lusikka
  - o 1 kertakäyttölusikka
  - o kertakäyttöhanskat
- 2 minigrip-pussia, joista molemmissa on
  - o kaksi (2) kannellista muovipurkkia
  - o 1 kertakäyttölusikka
  - o kertakäyttöhanskat
- Permanent-tussi
- Lomake näytteenkeräystietoja varten ja ohje ulosteen koostumuksen arvioimiseksi Bristol-asteikolla

#### Näytteenotto:

Lue ohje huolella läpi ennen näytteenottoa.

- **Pakasta kylmävaraajat** hyvissä ajoin ennen näytteen palautusta. Näytteet palautetaan tutkimusyksikköön pakastettuina ja kylmävaraajien kanssa styroxlaukkuun pakattuna. Samassa laukussa voi olla myös vuorokausivirtsanäytteet, jos palautat näytteet samana päivänä.
- **Ulostenäytteet kerätään kolmelta päivältä.** Päivien ei tarvitse olla peräkkäiset, mutta joka tapauksessa saman viikon (7 päivää) ajalta.
- **Kaikki** keräyspäivän tuotokset **punnitaan ensin vaa’alla** ja painot merkitään lomakkeeseen. Vain **yhdestä uloste-erästä per päivä otetaan näytteet** seuraavaa ohjetta noudattaen:
  - o Ulosta kaarimaljalle. **Punnitse tuotos vaa’alla ja merkitse paino lomakkeeseen. Arvioi ulosteen koostumus Bristol-asteikolla, joka on kuvattu tämän ohjeen lopussa, ja kirjaa ulosteen tyyppi taulukkoon asteikolla 1 – 7.**
  - o Jos ulostat useita kertoja päivässä, muista punnita kaikki tuotoksesi ja merkitä lomakkeeseen.
  - o Ota päivittäinen näyte vain yhdeltä ulostuskerralta, ei siis kaikilta kerroilta.
  - o Ota näyteputki ja –purkit pussista, jossa lukee PÄIVÄ 1.
  - o Ota ulostetta ensin näyteputkeen (tarrassa: Mikronäyte A) putken sisältämällä lusikalla **reilun lusikallisen** verran ulosteen keskikohdalta, ei alussa tulevasta mahdollisesti kovemmasta ”tulpasta”. Sulje korkki huolellisesti.



- Ota ulostetta (keskikohdalta) kertakäyttölusikalla kannellisiin muovipurkkeihin (tar-rassa: NÄYTE1A) noin 1/3 - puolet purkin tilavuudesta. Sulje kansi huolellisesti. Kaik-kea ulostetta ei tarvitse laittaa purkkeihin, kaada loput WC-pönttöön.
- Huolehdi, että ulostetta ei jää putken tai purkin ulkopuolelle.
- **Merkitse** putkessa sekä purkeissa oleviin tarroihin **näytteenottopäivämäärä** perma-nenttitussilla.
- **Laita putki ja purkit minigrip-pussiin**, jossa on nimesi, ja **pakasta välittömästi**.
- Suorita näytteenotto purkkeihin samalla tavalla myös PÄIVINÄ 2 ja 3.

#### **Näytteiden säilytys kotona ja kuljetus tutkimusyksikköön:**

- **Säilytä näytteet pakastimessa** nimikoiduissa minigrip-pusseissa siihen asti, kunnes toimitat näytteet Viikkiin.
- Tuo pakastetut näytteet **pakastettujen kylmävaraajien** kanssa styroxlaukussa. Voit tuoda samassa laukussa myös vuorokausivirtsanäytteet, jos tuot näytteet samaan ai-kaan ja jos ne mahtuvat samanaikaisesti kylmälaukkuun. Tarvittaessa ulostenäytteet voivat odottaa pakastimessa, mutta virtsanäytteet on tuotava tutkimuskeskukseen heti keräyksen päättymispäivänä.
  - Kuljetusta varten laita kylmävaraajat ja minigrip-pusseissa olevat näytteet vihreään muovipussiin ja solmi pussi tiiviiksi paketiksi. Tällä varmistetaan, et-tä näytteet eivät pääsisi sulamaan kuljetuksen aikana.
- Pakastetut näytteet voit palauttaa tutkimusyksikköön Viikkiin
  - kun tulet paastoverinäytteenottoon
  - tai jo ennen näytteenottopäivää klo 8 – 15.30 välisenä aikana; ilmoita tällöin tulostasi etukäteen puhelinnumeroon 02941 58326 joko soittamalla tai teks-tiviestitse.
- Minimoi näytteiden oloaika pakastimen ulkopuolella, **ulostenäytteet eivät saa sulaa** kuljetuksen yhteydessä!
- Muistathan palauttaa myös täytetyn lomakkeen.

Näytteenotto ja purkitus on helpointa suorittaa kotona, jossa kylmäsäily-tys/pakastaminen onnistuu paremmin. Jos ulostuskertoja on useita päivän aikana, **varau-du punnitsemaan ulosteesi myös kodin ulkopuolella**. Tällöin riittää, että pidät mukanaasi vaakaa, kaarimaljaa, ja punnituslomaketta. Varaa mukaasi myös roskapussi, jossa voit laittaa likaisen kaarimaljan roskikseen. Ulostaa kaarimaljalle, punnitse ja merkitse paino lomakkeeseen.

Kaikissa näytteenottoon liittyvissä kysymyksissä voit olla yhteydessä Essi Päivärintaan, (puh. 02941 58326, scenoprot-tutkimus@helsinki.fi).

**KIITÄMME SINUA OSALLISTUMISESTASI!**

ScenoProt-tutkimusryhmä  
Helsingin yliopisto, ravitsemustieteen osasto,  
Viikin kampus, EE-talo 2. krs



## Ulosteen koostumuksen arviointi Bristol-asteikolla

**Tyyppi 1:** erillisiä kovia kikkareita, jäniksen papanoita”



**Tyyppi 2:** yhtenäinen, kiinteä, selvästi kuhrainen ”pullapitko”



**Tyyppi 3:** makkaramainen, mutta murtumia pinnassa



**Tyyppi 4:** ”banaani”, sileä ja pehmeä



**Tyyppi 5:** pehmeitä erillisiä klönttejä, joissa on terävät, ”leikatut” reunat



**Tyyppi 6:** kuohkeaa, puuromaista; epätasaiset reunat



**Tyyppi 7:** täysin nestemäistä, ei kiinteitä paloja; ripuli



*Lähde: Heaton ym. 1992*

## Liite 2. Ulostevedeneristysprotokolla

Hae edellisenä päivänä näytteet pakastimesta kylmiöön sulamaan kannelliseen styrox-laukkuun, ja laita ultrasentrifuugin roottori kylmiöön jäähtymään. Näytteinä käytetään samalta henkilöltä kahden eri päivän näytettä, jotka yhdistetään. Merkataan asianomaiseen listaan, mitä näytteitä käytetään. HUOM! Säilytä näytteitä aina jäähauteessa.

### 1. Homogenointi ja ultrasentrifuugiputkien täyttö uloste- ja parasiittilaboratoriossa:

1.1. Laita homogenointiputki (käytetään 110 ml:n sentrifuugiputkea) jäiden kanssa dekantterilasiin. Mittaa vaa'alla molemmista näytepurkeista 10 g ulostetta homogenointiputkeen kertakäyttölusikkaa käyttämällä (siis 10 g + 10 g) ja lisää 20 g milli-Q-vettä. Tässä 0,1 g:n tarkkuus riittää.

- *Merkitse painot listaan.*

Yhdistä ulostenäytepurkit toiseen purkkiin ja merkitse teipillä kanteen, mitkä näytteet on yhdistetty. Pakasta yhdistetyt näytteet -70 asteessa.

1.2. Homogenoi IKA T-18 Ultra-Turrax –dispergointilaitteella noin 2 minuuttia kierrosluvulla 13–15000 rpm. Näytteiden välissä dispergointilaitte huuhdellaan kolmesti käyttämällä sitä hetken astiassa, jossa on milli-Q-vettä.

1.3. Siirrä homogenaattia kahteen Beckman Coulter ultrasentrifuugiputkiin 20 ml:n ruiskulla ja 14 G -kalkkineulalla. Jätä putkien kapeneva yläosa tyhjäksi. Jos homogenaatti on paksua, voi putkea kopauttaa pöytää vasten, jolloin homogenaatti painuu paremmin putken pohjalle. Putken kaulaosa kannattaa yrittää pitää puhtaana tasapainottamisvaiheen helpottamiseksi. Siirrä ylijäänyttä homogenaattia 15 ml:n Falcon-putkeen pakastamista varten. Sulje fuugiputket parafilmillä kuljetuksen ajaksi.

- *Merkitse Falcon putkeen tulevan homogenaatin summittainen määrä listaan.*

### 2. Näytteiden tasapainotus ja ultrasentrifuugaus:

2.1. Ota tasapainotukseen saman näytteen putkipari; nämä on loogisinta laittaa sentrifuugin roottorin vastakkaisille paikoille. Kuivaa putket. Tasapainota putket lisäämällä kevyempään putkeen tarvittava määrä Milli-Q-vettä. Tasapainotus tulee tehdä 0,001 g:n tarkkuudella käyttäen analyysivaakaa. Lisäys onnistuu parhaiten 0,5–10 µl:n tai 10–100 µl:n pipetillä. Jos putkien ero on suuri, voi käyttää myös pientä ruiskua ja neulaa.

- *Merkitse putkien lopullinen paino listaan.*

2.2. Tasapainotuksen jälkeen sulje putket Beckman Coulter Cordless Tube Topper –laitteella.

2.3. Fuugaa näytteitä 2 tuntia +4 asteessa 31 000 rpm tai 50 000 g. Laitte: Beckman Coulter Optima MAX Ultracentrifuge.

### 3. Ulosteveden talteenotto ja pH:n mittaus

3.1. Avaa fuugiputki leikkaamalla putken ”nypykkä” saksilla pois. Ime erottunut ulostevesi putkesta 20 ml:n ruiskulla ja kalkkineulalla. Varo, ettet riko pellettä. Siirrä ulostevesi 50 ml:n Falcon-putkiin.

3.2. Punnitse saatu ulostevesi.

- *Merkitse listaan*

3.4. Mittaa ulosteveden pH Accumet AB150 -laitteella.

- *Merkitse listaan*

### 4. Ulosteveden suodatus vetokaapissa

4.1. Ime ulostevesi Falcon-putkesta 20 ml:n ruiskuun kalkkineulalla ja vaihda ruiskuun neulan tilalle sopiva suodatin.

4.2. Ulostevesi pitää suodattaa lopuksi 0,2 µm:n suodattimella suoraan 2 ml:n kryoputkiin, jolloin vedestä tulee steriiliä. Esisuodatukset voi tehdä näytteen sameuden mukaan portaattain 0,45–5,0 µm:n suodattimilla samaan Falcon-putkeen. Jos suodatin menee tukkoon, vaihda suodatin joko isompaan tai toiseen samankokoiseen; liika paine ruiskussa voi ”räjäyttää” näytteen ympäri vetokaappia. Esisuodatuksien jälkeen voit käyttää samaa neulaa suodoksen imemiseksi takaisin ruiskuun. Suodattimina käytetään Sartorius Minisart -kertakäyttösuodattimia.

4.1. Suodatetut ulostevesinäytteet kryoputkissa säilytetään -70--80 celsiusasteessa.

### **Jätteiden käsittely:**

Laita kaikki ulosteen tahrinat roskat erilliseen kaksinkertaiseen autoklaaviroskapussiin (punainen pussi), sido pussit ja jätä kylmiöön. Teräville ja viiltäville roskille oma asianmukainen roskis.

### **Kertakäyttöiset tarvikkeet yhtä näytettä kohti:**

1. Homogenointi ja ultrasentrifuugiputkien täyttö

- 110 ml:n sentrifuugiputki
- 2 kpl kertakäyttölusikkaa
- kalkkineula
- ruisku 20 ml
- 2 kpl Beckman Coulter ultrasentrifuugiputkia
- Falcon-putki 15 ml

2. Näytteiden tasapainotus ja ultrasentrifuugaus:

- Pipetinkärkiä

3. Ulosteveden talteenotto ja pH:n mittaus

- ruisku 20 ml
- kalkkineula
- Falcon-putki 50 ml

4. Ulosteveden suodatus vetokaapissa

- Käytä edellisen kohdan Falcon-putkea
- ruisku 20 ml
- kalkkineula
- suodattimia Sartorius Minisart
- kryoputkia 3–5 kpl

## Liite 3. ScenoProtin HCA-7-solujen ulostevesialtistuskokeen työohje

### 1. Solujen sulatus:

Valmista kasvatusliuos (DMEM+): DMEM 500 ml + FBS 50 ml + pen-strep-antibioottiliuos 5 ml + L-glutamiiniliuos 5 ml.

Ota soluputki nestetypestä. Sulata putki (1 ml) 37-asteisessa vesihauteessa 1–2 min. Siirrä pipetillä T25 pulloon ja lisää 9 ml DMEM+. Vaihda kasvatusliuos noin vuorokauden kuluttua uuteen. Siirrä isompaan T75-pulloon, kun konfluenssi on noin 70–90 %

### 2. Solujen irrotus T25-kasvatuspullosta ja siirto T75-pulloon:

1. Tarkista, että konfluenssi on noin 70–90 %.
2. Poista kasvatusliuos pullosta pipetillä.
3. Huuhtelee soluja PBS-puskurilla (3 ml) kaksi kertaa noin 10 s.
4. Lisää pulloon trypsiiniliuosta 2–2,5 ml.
5. Inkuboi kasvatuskaapissa 10 min. Solujen pitäisi olla inkuboinnin jälkeen kirkkaita ja pyöreitä, mutta ne eivät välttämättä ole irronneet pohjasta. Terävä kopautus tai pari pulloa kylkeen auttaa irrottamaan solut.
6. Lisää DMEM+ 7,5–8 ml huuhtellen samalla pullon pohjaa. Ota liuos (solususpensio) takaisin pipettiin ja toista huuhtelu muutaman kerran, jotta loputkin solut irtoaisivat pohjasta ja toisistaan.
7. Siirrä suspensio pipetillä isompaan T75-pulloon ja lisää 5 ml DMEM+. Laita pullo kasvatuskaappiin.

### 3. Jatkokasvatus ja jakaminen

Tehdään kohdissa 2.1.–2.6. kuvatulla tavalla ja samoilla liuosmäärillä. Suspension voi siten siirtää vanhasta pullosta pipetillä Falcon-putkeen tai suoraan uusiin kasvatuspulloihin. Kun jaetaan T75-pullo, tyypillinen istutustiheys on 3 ml solususpensiota ja 12 ml DMEM+. Tästä voi poiketa riippuen siitä, kuinka nopeasti haluaa uusien pullojen olevan valmiit uuteen jakoon tai kokeisiin, mutta pulloon laitettava yhteistilavuus on aina 15 ml.

### 4. Kuoppalevyn valmistelu

1. Irrota solut T75-pullostakohtien 2. ja 3. kuvaamalla tavalla ja siirrä suspensio 50 ml Falcon-putkeen.
2. Mittaa suspension solutiheys Countess Automated Cell Counter -laitteella pipetoimalla 0,5 ml eppendorf-putkeen 100 µl solususpensiota (muista sekoittaa, muuten solut painuvat pohjaan!) ja 100 µl trypan blue -väriainetta. Sekoita seosta pipetillä. Pipetoi 10 µl seosta laskentalevyn kumpaankin kammioon. Suorita laskenta ja laske kahden mittauksen keskiarvon perusteella sopiva solususpension laimennos, jotta solutiheys on  $2 \times 10^5$ /ml. Lisää tarvittava määrä DMEM+:aa.
3. Pipetoi 8–10 ml suspensiota pipetointikaukaloon (Sekoita ensin!). Pipetoi sitten monikanavapipetillä 100 µl suspensiota 96-kuoppalevyn kuoppiin 1–9 järjestyksessä 147258369. Sekoita suspensiota pipetointien välissä!
4. Nimeä kuoppalevy ja siirrä se kasvatuskaappiin 24 tunniksi. Merkitse levyn valmistumisaika muistiin.

### 5. Ulostevesialtistus (Kts. kuoppalevykartta)

Valmista kuoppalevyliuos (DMEM1%): DMEM 500 ml + FBS 5 ml (= 1 %) + pen-strep 5 ml + L-glut 5 ml.

1. Ota FW-näytteet (7 kpl) sulamaan huoneenlämpöön n. 30 min etukäteen. Pidä sulaneet näytteet jäässä!
2. Tee sitten jokaisesta näytteestä kolme laimennosta (10 %, 20 % ja 30 %) 0,5 ml Eppendorf-putkiin pipetoimalla vastaavasti DMEM1 + FW-näyte: 450 µl + 50 µl; 400 µl + 100 µl; 350 µl + 150 µl. Järjestä laimennokset koeputkitelineeseen!
3. Ota 24 h kasvatettu kuoppalevy kasvatuskaapista. Poista pipetillä vanha kasvatusliuos

kuopista A1, A2 ja A3. Vaihda pipetinkärki. Sekoita pipetillä 10 % laimennosta muutaman kerran ja pipetoi sitä 100 µl ensin soluttomaan kuoppaan A10 ja sitten tyhjennettyihin kuoppiin A1–A3. Vaihda pipetinkärki. Toista tämä kuoppien A11, A4, A5 ja A6 kohdalla (20 % laimennos) sekä kuoppien A12, A7, A8 ja A9 kohdalla (30 %).

4. Toista edellinen riveille B–G.

5. Poista myös kontrollisoluriviltä H vanha kasvatusliuos kuopista H1–H9 ja pipetoi 100 µl DMEM1 kuoppiin H10, H11 ja H1–H9. H12 jätetään tyhjäksi.

6. Siirrä levy kasvatuskaappiin 24 tunniksi ja merkitse levyn valmistumisaika muistiin.

## 6. Absorbanssin mittaus

1. 24 tunnin altistuksen jälkeen ota kuoppalevy kasvatuskaapista ja tee absorbanssin nollamittaus.

2. Laita CCK-8-reagenssia pipetointikaukaloon ja pipetoi 10 µl reagenssia monikanavapi-  
petillä pipetointikaukalosta jokaiseen kuoppaan. Vaihda pipetinkärjet joka rivin jälkeen,  
jotta reagenssi ei kontaminoidu; ylijäänyt reagenssi siirretään takaisin pulloonsa.

3. Siirrä levy kasvatuskaappiin ja merkitse aika muistiin.

4. Tee uusi absorbanssimittaus 4 tunnin kuluttua.

5. Ota mikroskooppikuvat jokaisen levyerän ainakin yhdestä levystä pystyriveistä 3, 6, 9 ja 12 tai jokaista laimennosta parhaiten edustavasta kuopasta sekä kuopasta H11. Muuten ota kuvia, jos kuopissa on poikkeavuuksia.

**Kuoppalevykartta**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	N1 10 %	N1 10 %	N1 10 %	N1 20 %	N1 20 %	N1 20 %	N1 30 %	N1 30 %	N1 30 %	N1, NC 10%	N1, NC 20 %	N1, NC 30 %
B	N2 10 %	etc.	...	N2 20 %	etc.	...						
C	N3 10 %	...		etc.								
D	N4 10 %			...								
E	N5 10 %											
F	N6 10 %											
G	N7 10 %											
H	CC + DMEM 1	CC + DMEM 1	CC + DMEM 1	CC + DMEM 1	CC + DMEM 1	CC + DMEM 1	CC + DMEM 1	CC + DMEM 1	CC + DMEM 1	vain DMEM 1	vain DMEM 1	tyhjä (cck- 8)

N = näyte; NC = ei soluja; CC = kontrollisolut

**Tarvikkeet kaappiin****3. Jakaminen**

- jäteastia
- liuokset: PBS, trypsiini ja DMEM+
- moottoripipetti + kärkiä: 1–2x25 ml, 1–2x10 ml 4x5 ml
- Falcon-putkiteline liuoksille
- T75-kasvatuspulloja tarvittava määrä

**4. Kuoppalevyn valmistelu**

- jäteastia
- liuokset: PBS, trypsiini ja DMEM+
- moottoripipetti + kärkiä: 1–2x25 ml, 1–2x10 ml 4x5 ml
- Falcon-putki 50 ml, solususpensiolle
- Falcon-putkiteline
- Finnpipetit 100 µl ja 10 µl + kärkiä
- Eppendorf-putkia 1kpl + -teline
- trypan blue -väriaine
- solulaskentaliuska
- monikanavapipetti + kärkiä
- kuoppalevy
- pipetointikaukalo

**5. Ulosteviesialtistus**

- matala jäteastia tai Falcon-putki jätteelle
- DMEM1% 9,5 ml + pipetointivara
- kuoppalevykartta tms. muistiinpano
- FW-näytteet 7 kpl
- FW-näytteille teline
- 0,5 ml:n Eppendorf-putkia 21 kpl
- Eppendorf-teline 1–2
- Finnpipetti 350–450 µl + kärkiä 3 kpl
- Finnpipetti 50–100 µl + kärkiä

**6. Absorbanssin mitta**

- CCK-8-reagenssia
- monikanavapipetti 10 µl + laatikko kärkiä
- pipetointikaukalo



#### **Liite 4. Ulosteveden ja WST-8-reagenssin välinen interaktio**

WST-8-reagenssin ja ulosteveden välisen interaktion mittaaminen oli tässä tutkimuksessa uusi asia, jota aiemmassa vastaavassa koejärjestelyssä ei vielä osattu ottaa huomioon (49). Ylipäätään kirjallisuudesta ei löytynyt tutkimuksia, jossa olisi tutkittu tätä interaktiota, joten tämä tutkimus on mielenkiintoinen menetelmän testauksenkin vuoksi.

##### **Interaktioabsorbanssi ja ryhmien väliset erot interaktiossa**

Ulosteveden ja WST-8-reagenssin välistä interaktiota tutkittiin käyttäen analyyseissä soluttomissa ulostevesinäytekuopissa mitattuja absoluuttisia absorbanssilukemia. Toinen tapa olisi ollut laskea interaktiollekin kuvitteellinen viabiliteettilukema, mutta se olisi vaihdellut kuoppalevystä toiseen; viabiliteetti lasketaan suhteessa kontrollisolukuoppien absorbanssiin, ja kontrollisolujen määrä vaihteli mm. pipetointiin ja solulaskentaan liittyvien epätarkkuuksien vuoksi levyjen välillä, joten myös kontrollisolujen tuottaman absorbanssin voimakkuus vaihteli.

Interaktiossa ei ollut ryhmien välillä eroa alkupisteessä. Loppupisteen kovariansianalyysissä oli kuitenkin eroja kaikissa ulosteveden pitoisuuksissa, ja ryhmän 1 interaktioabsorbanssi oli suurin (taulukko L1). Jokin interventiossa vaikutti ulosteveeseen niin, että eri ruokavaliota syöneiden ulostevedet reagoivat eri tavalla WST-8-reagenssin kanssa.

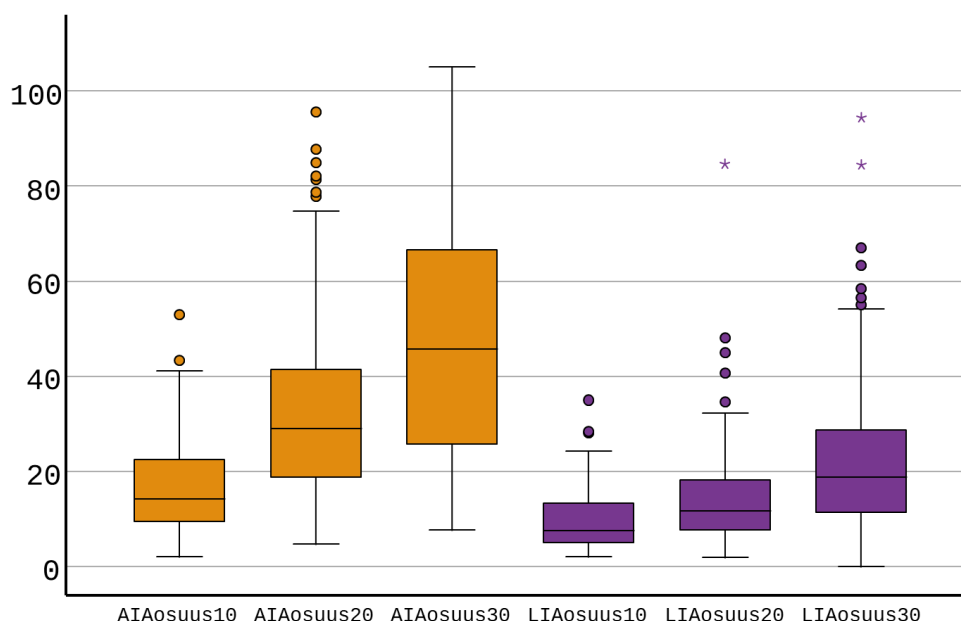
**Taulukko L1.** WST-8-reagenssin ja ulosteveden väliset interaktioabsorbanssit alku- ja loppupisteissä, interaktioabsorbanssien muutos sekä WST-8-reagenssin ja ulosteveden välisten loppupisteen interaktioabsorbanssien kovariaattikorjatut keskiarvoestimaatit (kovariaattina alkupisteen interaktioabsorbanssi) eri ulostevesipitoisuuksilla ruokavalioryhmittäin

Ulostevesi-pitoisuus		Interventioryhmä (N)			p (ANOVA)
		ELÄIN (46)	50/50 (44)	KASVI (43-44)	
		Interaktioabsorbanssi alku- ja loppupisteissä sekä muutos			
10 til-%	Alkupiste	0,121 ± 0,067	0,114 ± 0,062	0,126 ± 0,076	0,727
	Loppupiste	0,104 ± 0,055	0,087 ± 0,048	0,078 ± 0,047	0,048
	Muutos	-0,018 ± 0,054	-0,027 ± 0,054	-0,048 ± 0,062	0,034
20 til-%	Alkupiste	0,145 ± 0,074	0,153 ± 0,077	0,162 ± 0,100	0,627
	Loppupiste	0,122 ± 0,062	0,104 ± 0,049	0,099 ± 0,062	0,142
	Muutos	-0,023 ± 0,059	-0,050 ± 0,067	-0,062 ± 0,081	0,023
30 til-%	Alkupiste	0,175 ± 0,094	0,196 ± 0,105	0,198 ± 0,122	0,519
	Loppupiste	0,151 ± 0,075	0,125 ± 0,063	0,133 ± 0,077	0,213
	Muutos	-0,023 ± 0,085	-0,071 ± 0,105	-0,068 ± 0,099	0,037
		Loppupisteen interaktioabsorbanssin kovariaattikorjattu keskiarvoestimaatti			p (ANCOVA)
10 til-%		0,103 ± 0,006(a)	0,090 ± 0,006(a,b)	0,075 ± 0,006(b)	0,006*
20 til-%		0,126 ± 0,007(a)	0,103 ± 0,007(a,b)	0,096 ± 0,007(b)	0,012**
30 til-%		0,156 ± 0,009(a)	0,123 ± 0,010(b)	0,130 ± 0,010(a,b)	0,036***

(a), (b) ja (c): Tulokset, joissa on eri kirjain, eroavat toisistaan merkitsevästi. Ryhmien väliset keskinäiset vertailut Bonferroni-korjauksella: \*ELÄIN vs KASVI: p=0,004; \*\*ELÄIN vs KASVI: p=0,013; \*\*\*ELÄIN vs 50/50: p=0,047

Interaktion vähentämisen vaikutus itse viabiliteettituloksiin on esitetty tulososiossa luvussa 6.4. (taulukko 4).

Havainnollisuuden vuoksi laskettiin vielä, kuinka suuren osuuden (%) laskennallinen interaktioabsorbanssi muodostaa kokonaisabsorbanssista: Ensin vähennettiin kokonaisviabiliteettituloksesta (taulukko 1) viabiliteettitulo, josta oli sitä laskettaessa ensin vähennetty interaktioabsorbanssi (taulukko 4). Tämän jälkeen laskettiin tuloksen prosenttiosuus kokonaisviabiliteettituloksesta. Keskimäärin osuudet olivat alkupisteessä pitoisuuksia 10 til-%, 20 til-% ja 30 til-% vastaavasti (%): 16,2 ± 9,8; 32,7 ± 20,3; 47,8 ± 26,1; ja loppupisteessä (%): 9,2 ± 6,1; 14,4 ± 10,8; 22,4 ± 16,4 (kuva L1).



**Kuva L1.** Mitatun interaktioabsorbanssin osuus (%) kokonaisabsorbanssista. A: alkupiste; L: loppupiste; IA: interaktio; 10, 20 ja 30: ulosteveden pitoisuus (til-%). Laatikoiden sisällä on puolet havainnoista, poikkiviiva laatikossa ilmaisee mediaanin ja janojen sisällä on yli ja alin neljännes ääriarvoineen.

### Korrelaatiot interaktion kanssa

Kun tarkasteltiin korrelaatioita interaktion ja muutaman muun muuttujan välillä havaittiin verrattain vahva korrelaatio pH:n ja interaktioabsorbanssin välillä (taulukko L2). Tämä oli tilastollisesti merkitsevä kaikilla pitoisuuksilla sekä alku- että loppupisteessä. Muuten alkupisteessä korreloi interaktion kanssa vain kuidun saanti hieman negatiivisesti. Loppupisteessä kuidunsaannin negatiivinen korrelaatio oli selvästi vahvempi ja ilmeni kaikilla pitoisuuksilla. Loppupisteessä korreloi lisäksi energiansaanti kaikilla pitoisuuksilla sekä proteiinin saanti (g) 20 til-%:n pitoisuudella.

**Taulukko L2.** WST-8-reagenssin ja ulosteveden välisen interaktion, BMI:n, ulosteveden pH:n ja ravintotekijöiden välisiä korrelaatioita

Ulostevesi-pitoisuus (til-%)		Alkupisteen interaktio			Loppupisteen interaktio		
		10	20	30	10	20	30
<b>BMI</b>	<b>R</b>	-0,159	-0,154	-0,154	-0,115	-0,126	-0,138
	<b>p</b>	0,067	0,077	0,077	0,186	0,146	0,113
<b>pH</b>	<b>R</b>	<b>,473**</b>	<b>,264**</b>	<b>,183*</b>	<b>,584**</b>	<b>,454**</b>	<b>,365**</b>
	<b>p</b>	0,000	0,002	0,034	0,000	0,000	0,000
<b>Energia</b>	<b>R</b>	-0,168	-0,167	-0,130	<b>-,252**</b>	<b>-,262**</b>	<b>-,220*</b>
	<b>p</b>	0,054	0,055	0,138	0,003	0,002	0,011
<b>Proteiini (g)</b>	<b>R</b>	-0,062	-0,088	-0,065	-0,114	<b>-,188*</b>	-0,163
	<b>p</b>	0,478	0,316	0,457	0,192	0,030	0,062
<b>Proteiini (E%)</b>	<b>R</b>	0,071	0,034	0,024	0,140	0,048	0,042
	<b>p</b>	0,421	0,699	0,789	0,108	0,586	0,629
<b>Kalsium</b>	<b>R</b>	0,018	-0,012	-0,029	0,119	0,080	0,062
	<b>p</b>	0,839	0,892	0,745	0,172	0,358	0,480
<b>Kuitu (g)</b>	<b>R</b>	<b>-,192*</b>	<b>-,174*</b>	-0,153	<b>-,293**</b>	<b>-,299**</b>	<b>-,284**</b>
	<b>p</b>	0,027	0,046	0,081	0,001	0,000	0,001

R: Pearsonin korrelaatiokerroin; \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$

Korrelaatioita tutkittiin myös sen viabiliteettilukeman kanssa, joka oli saatu vähentämällä interaktioabsorbanssi. Verrattuna taulukossa 3 esitettyihin korrelaatioihin, saatiin tässä vahvemmat korrelaatiot BMI:n ja proteiinin saannin (g) kanssa sekä alku- että loppupisteissä (taulukko L3). Myös energian- ja kuidun saanti korreloivat vahvemmin, mutta ainoastaan alkupisteessä; nämä eivät tosin korreloineet loppupisteessä ennen interaktion vähentämistään. Sen sijaan korrelaatio pH:n kanssa hävisi tyystin sekä alku- että loppupisteessä, ja loppupisteessä heikko korrelaatio proteiinin saannin (E%) kanssa jäi vain pitoisuudelle 30 til-%. Kalsiumin saanti korreloi hyvin samansuuntaisesti kuin ilman interaktion vähentämistä.

**Taulukko L3.** Viabiliteetin, josta on vähennetty WST-8-reagenssin ja ulosteveden välinen interaktio, BMI:n, pH:n ja ravintotekijöiden välisiä korrelaatioita

Ulostevesi- pitoisuus (til-%)		Alkupisteen viabiliteetti interaktio vähennettynä			Loppupisteen viabiliteetti interaktio vähennettynä		
		10	20	30	10	20	30
<b>BMI</b>	<b>R</b>	<b>,212*</b>	<b>,236**</b>	<b>,243**</b>	<b>,224**</b>	<b>,380**</b>	<b>,329**</b>
	<b>p</b>	0,014	0,006	0,005	0,009	0,000	0,000
<b>pH</b>	<b>R</b>	0,022	0,100	0,019	0,046	0,119	0,144
	<b>p</b>	0,801	0,252	0,823	0,596	0,170	0,099
<b>Energia</b>	<b>R</b>	<b>,303**</b>	<b>,258**</b>	<b>,243**</b>	0,132	0,069	0,079
	<b>p</b>	0,000	0,003	0,005	0,129	0,429	0,368
<b>Proteiini (g)</b>	<b>R</b>	<b>,321**</b>	<b>,280**</b>	<b>,203*</b>	<b>,218*</b>	0,133	<b>,213*</b>
	<b>p</b>	0,000	0,001	0,020	0,012	0,126	0,014
<b>Proteiini (E%)</b>	<b>R</b>	0,127	0,131	0,049	0,162	0,103	<b>,213*</b>
	<b>p</b>	0,146	0,135	0,575	0,062	0,237	0,014
<b>Kalsium</b>	<b>R</b>	<b>,280**</b>	<b>,196*</b>	<b>,176*</b>	0,153	0,107	0,132
	<b>p</b>	0,001	0,024	0,043	0,078	0,222	0,133
<b>Kuitu (g)</b>	<b>R</b>	<b>,216*</b>	<b>,194*</b>	<b>,253**</b>	0,045	-0,069	0,021
	<b>p</b>	0,013	0,026	0,003	0,609	0,432	0,811

R: Pearsonin korrelaatiokerroin; \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$

### Pohdintaa interaktiosta ja sen merkityksestä

Pelkän interaktion aikaansaama absorbanssi oli paikoin varsin suuri, jopa kymmeniä prosentteja solullisten kuoppien absorbanssista (kuva L1). Reagenssin valmistaja huomauttaa käyttöohjeessaan (80), että WST-8 saattaa reagoida pelkistävien yhdisteiden kanssa ja muodostaa värillistä formazania, mikä siis lisäisi absorbanssia ja nostaisi mitattua viabiliteettilukemaa. Ulostevedellä on selvästi itsenäistä pelkistyspotentiaalia. On myös mahdollista, että homogenoinnin yhteydessä kenties hajonneista mikrobeista olisi tullut pelkistäviä entsyymeitä ulosteeseen. Jos lisäksi mikrobiperäisten entsyymien aktiivisuus olisi pH:sta riippuvaista kuten luvussa 7.4.2. spekulointiin, on tämäkin voinut vaikuttaa interaktion suuruuteen ja ryhmien välisiin eroihin interaktiossa. Kaikkein vahvin korrelaatio tässä tutkimuksessa havaittiinkin interaktion ja ulosteveden pH:n välillä, joten voi olla, että interaktio olisi jotenkin riippuvaista pH:sta.

Interaktiossa havaittiin myöhemmin toinenkin odottamaton piirre: Identtisiä solukokeita toisilla solulinjoilla (joiden tulokset eivät varsinaisesti kuulu tämän opinäytteen laajuuteen) on tehty samaisessa ScenoProt-tutkimuksessa tämän kirjoittajankin toimesta jo muitakin. Kokeiden yhteydessä tehtyjen interaktiomittausten tulosten alustavien tarkastelujen perusteella interaktioabsorbanssin keskiarvo vaihtelee koesarjasta toiseen, ja ero on suurimmillaan yli kaksinkertainen. Tämä on kummallista, sillä kyseessä on samojen ulostevesinäytteiden kanssa tehdyt identtiset interaktiomittaukset, jolloin luonnollisesti tuloksien pitäisi olla mittaus-tarkkuuden rajoissa identtiset. Kyse voi olla jostain näytteiden käsittelystä johtuvasta systemaattisesta virheestä, jota ei ole osattu ottaa huomioon näytteidenkäsittelyprotokollaa kehitettäessä, mutta valitettavasti tällaista virhelähdettä ei onnistuttu selkeästi osoittamaan. Jonkin verran on aiemmin tutkittu uloste- ja ulostevesinäytteiden käsittelyn, säilytyksen ja ulosteveden eri valmistustapojen vaikutuksia ulosteveden metabolomiin ja havaittu, että erilaiset protokollat tuottavat hieman erilaisia metaboliittiprofiileita (94–102). Tämä oletettavasti vaikuttaisi myös viabiliteettimittauksiin. Valitettavasti standardisoitua ja yleisesti hyväksyttyä protokollaa näytteiden käsittelyyn ei vielä ole kehitetty.

Vaikka ryhmien väliset erot interaktiossa olivatkin merkitseviä, oli interaktio silti sen verran pieni, että sen vaikutus tuloksiin jäi vähäiseksi, kuten luvussa 7.3. todetaan. Silti näiden tulosten perusteella näyttää siltä, että koesysteemissä ei aivan kaikki mahdollista harhaa aiheuttavat tekijät ole vielä hallinnassa. Jos WST-8-menetelmää käytetään jatkossa, olisi syytä tarkastella interaktiota ulosteveden kanssa tarkemmin ja yrittää löytää siihen vaikuttavat tekijät. Interaktion vaikutuksen eliminoiminen vähintäänkin pienentäisi tulosten hajontaa, ja sitä myötä mittausten tarkkuus paranisi.